

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第44卷第4期(总第206期)

2019年8月18日出版

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

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院动物卫生研究所

广东省畜牧兽医学会

主 编:蒋宗勇

责任编辑:黄琳 马新燕 康桦华 吕晓慧

张洁华 王片片

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 顾万军 曹俊明 廖 明

曾振灵 毕英佐 徐志宏 舒鼎铭

王贵平 王政富 熊惠军 吴玄光

刘清神

特邀编委:

陈 峰 林旭堃 李 岩 陈瑞爱

罗满林 向 华 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大夫一街1号(510640)

电话:020-87576452

传真:020-87576452

网址: <http://www.gdaav.org>

E-mail: gdxmsykj@163.com

印刷单位:广州市德艺彩印有限公司

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

定价:10.00元

广告发布登记通知书编号:440000100115

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

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

目 录

·行业动态·

当前非洲猪瘟流行状况、诊断及防控措施·····黎金荣,关蕴,等(1)

非洲猪瘟防控期间现场排查方法与建议·····谭结敏(6)

非洲猪瘟诊断方法研究进展·····康桦华,张春红,等(10)

·专题综述·

鹌鹑羽色性状分子遗传机制研究进展·····何艺平,马荆鄂,等(14)

基于用户有效信息行为的学科服务实践探索·····张琴,董尚智(18)

浅谈藏区特色农产品质量提升与流通平台建设·····吴文栋,林伟君,等(22)

·畜牧技术·

猪场免疫防控工作要点·····容庭,刘志昌,等(25)

基层建设病死畜禽无害化处理体系工作中的问题及对策·····岑兴洪(29)

·兽医临床·

狂犬病灭活疫苗(dG株)在茂名地区应用效果分析·····薛素强,李冰,等(32)

三例剑羚幼仔腹泻病的诊治报告·····张天佑,马祥(36)

一例犬腹膜心包横膈疝的诊断·····张学辉,刘恒群,等(38)

·试验研究·

猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)冻融后稳定性研究·····胡美容,郑铁锁,等(41)

高效液相色谱法测定癸氧喹酯溶液含量·····曾海波,陈创华(47)

·信息之窗·

欢迎订阅本刊·····(9)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

AUG.2019 Volume 44, Number 4 (Total No.206)

Main Content

- Current epidemic situation, diagnosis and control measures of African Swine Fever LI Jinrong, GUAN Yun , et al(1)
- Methods and suggestions of on-site troubleshooting during the prevention and control of African Swine Fever TAN Jieming(6)
- Advances in diagnostic methods of African Swine Fever KANG Huahua, ZHANG Chunhong, et al(10)
- Advances in Molecular genetic mechanisms of the characteristics of feather color in quail HE Yiping, MA Jing, et al(14)
- Practical exploration of subject service based on users' available information behavior ZHANG Qing, DONG Shangzhi(18)
- Discussion on quality improvement and circulation platform construction of characteristic agricultural produces in Tibet
..... WU Wendong, LIN Weijun, et al(22)
- Key points of immunization prevention and control in pig farms RONG Ting, LIU Zhichang, et al(25)
- Problems and countermeasures of the primary system for harmless treatment for dead livestock and poultry ... CEN Xinghong(29)
- Application of inactivated Rabies Vaccine (dG strain) in Maoming XUE Suqiang, LI Bing, et al(32)
- Diagnosis and treatment of three cases of diarrhea disorders in young Oryx ZHANG Tianyou, MA Xiang(36)
- Diagnosis of peritoneal pericardial diaphragmatic hernia in dog ZHANG Xuehui, LIU Hengqun, et al(38)
- Stability of inactivated vaccine against Mycoplasma Pneumoniae (GD0503 strain) after freeze-thaw
..... HU Meirong, ZHENG Tiesuo, et al(41)
- Determination of decoxyquinone solution by high performance liquid chromatography ZENG Haibo, CHEN Chuanghua(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

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

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

Fax: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

当前非洲猪瘟流行状况、诊断及防控措施

黎金荣, 关蕴, 武文博, 张俊生, 薛倩, 刘静, 王霞, 何婉婷, 孙海亮, 焦培荣*
(华南农业大学兽医学院, 人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室, 农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:非洲猪瘟由非洲猪瘟病毒感染引起的一种烈性、广泛出血性传染病, 其发病率和死亡率可达100%, 是我国法定的一类动物疫病。2018年8月我国首次报道了非洲猪瘟疫情, 截至2019年4月12日已有30个省份共121起疫情, 对养猪业造成了严重的损失。为了提高从业人员对非洲猪瘟的认识, 增强预防和防控能力, 本文从非洲猪瘟的病原学、流行病学、诊断方法和防控措施与挑战四个方面进行了概述。

关键词:非洲猪瘟; 流行状况; 诊断; 防控措施

中图分类号:S851.33 文献标识码:C 文章编号:1005-8567(2019)04-0001-05

Current epidemic situation, diagnosis and control measures of African Swine Fever

LI Jinrong, GUAN Yun, WU Wenbo, ZHANG Junsheng, XUE Qian, LIU Jing,
WANG Xia, HE Wanting, SUN Hailiang, JIAO Peirong*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University; Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong; Key Laboratory of Animal Vaccine Development, the Ministry of Agriculture; National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control; Guangzhou 510642, China)

Abstract: African swine fever (ASF) is a kind of extensive hemorrhagic infectious disease caused by African swine fever virus (ASFV), the morbidity and mortality of ASF even reach to 100%, so it was placed the class one infectious diseases in China. African swine fever case was first reported in China at August 2018. Until Apr 12, 2019, African swine fever virus have caused 121 outbreaks in 30 provinces of China, so it produces serious losses to the swine industry in China. In order to better understand African swine fever and prevent and control this disease, we review the etiology, epidemiology, diagnosis and prevention control of African swine fever.

Keywords: African swine fever; current epidemic; diagnosis; prevention control

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染猪而引起的一种烈性、广泛出血性传染病, 其最急性和急性型的发病率和死亡率高达100%, 是世界动物卫生组织(OIE)法定报告的动物疫病之一, 我国

将其列为一类动物疫病。

1921年, ASF首次报道于非洲的肯尼亚, 目前ASFV的流行区域已由非洲大陆、意大利的撒丁岛地区延伸到高加索地区及部分东欧国家, 2018年8月, 我国的辽宁沈阳首次报道了非洲猪瘟, 并在随后8个

收稿日期:2019-06-10

作者简介:黎金荣(1994-), 男, 广东清远人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病学研究。E-mail:1095297433@qq.com

*通讯作者:焦培荣, E-mail:prjiao@scau.edu.cn

多月内新的疫情陆续有发生,截止至2019年4月12日,我国公布了121起疫情覆盖了30个省份,全国累计扑杀生猪造成的直接经济损失达数十亿元^[1]。

历史上发生过ASF疫情的许多国家,至今有的仍局部暴发和流行,但在巴西和欧洲许多的国家,通过扑杀等应对措施,在20世纪90年代基本清除了ASF。这从正反两面给予我们思考,如何应对我国目前严峻的ASF疫情。本文从ASF的病原学、流行病学、诊断方法和防控措施与挑战四个方面进行概述,以期提高从业人员对ASF的认识,增强对ASF防范意识,为我国ASF防控提供参考。

1 病原学

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染猪引起的一种急性、广泛出血性、烈性传染病。ASFV在分类上,是非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属的唯一成员。ASFV为双股线性DNA病毒,基因组大小为170~194 kb,可编码蛋白质达151~167种,其中已被鉴定的P72、P12、P30、P54等蛋白具有良好的抗原性而被广泛研究。根据p72基因末端约500 bp核苷酸的不同,现已鉴定出24种ASFV基因型,但它们在诱导保护性免疫反应中的作用尚不清楚。

ASFV结构复杂在自然环境中抵抗力较强,低温条件下病毒可存活6个月乃至数年;pH值4~10条件下活性稳定,但对高温敏感,60℃仅能存活20分钟,一般消毒剂能杀灭ASFV,其对乙醚、氯仿和去污剂敏感,2%氢氧化钠、2%~3%次氯酸钠、0.3%福尔马林等消毒剂也能够有效灭活ASFV。

2 流行病学

2.1 国外流行状况

1921年,首次报道了非洲肯尼亚的ASF疫情,之后非洲南部、中部和东部先后发生ASF疫情,至今非洲中南部仍是ASF的主要疫区。60~80年代,传播到葡萄牙,西班牙等西欧国家和古巴,巴西等拉丁美洲。到21世纪初,ASF已经传播到包括格鲁吉亚,俄罗斯在内的多个东欧国家。世界动物卫生组织公布,2016~2018年10月30日全球共报告发生了7023起疫情,其中绝大多数集中发生在欧洲。并表示从2016年至今,全球的ASF疫情发

生明显增加^[2]。

2.2 国内流行状况

2018年8月,我国首次报道辽宁沈阳发生了ASF疫情,截止至2019年4月12日,共有30个省份发生了121起疫情,其中包括3起野猪感染。具体如表1所示。从地理位置分布上看,具体如图1(图见第52页),疫点分散,没有出现大面积流行^[3]。目前有研究表明,传入我国的非洲猪瘟病毒为基因II型,与格鲁吉亚、俄罗斯、波兰公布的毒

表1 我国各省份ASF流行情况

最早报告时间	省份	疫情数(起)	疫点存栏总量(头)	发病总数(头)	死亡总数(头)	平均发病率(%)	死亡率(%)
2018.8.3	辽宁	18	42458	2276	1963	/	/
2018.8.16	河南	2	260	178	94	/	53
2018.8.19	江苏	3	97	627	97	/	15
2018.8.22	浙江	2	2280	486	396	/	81
2018.8.30	安徽	9	11018	586	408	/	/
2018.9.5	黑龙江	6	74649	5044	472	/	/
2018.9.14	内蒙古	6	1154	348	311	30	89
2018.9.21	吉林	4	1458	209	204	/	98
2018.10.12	天津	2	1270	292	256	/	/
2018.10.17	山西	5	8379	176	110	2	63
2018.10.21	云南	7	2143	753	654	/	/
2018.10.23	湖南	8	13443	729	400	5	55
2018.10.25	贵州	4	241	80	80	33	100
2018.11.4	重庆	3	423	20	12	5	60
2018.11.7	湖北	6	1892	62	28	3	45
2018.11.8	江西	3	463	75	63	16	84
2018.11.8	福建	3	22247	147	123	1	84
2018.11.16	四川	6	792	197	145	/	/
2018.11.17	上海	1	314	50	11	16	22
2018.11.23	北京	4	14050	138	129	/	/
2018.12.2	陕西	4	11857	459	222	4	48
2018.12.12	青海	1	69	14	14	20	100
2018.12.19	广东	3	6167	52	31	1	60
2019.1.12	宁夏	1	57	26	13	50	46
2019.1.13	甘肃	2	299	169	46	57	27
2019.2.18	广西	2	26727	1653	944	6	57
2019.2.20	山东	1	4504	17	3	1	18
2019.2.24	河北	1	5600	/	/	/	/
2019.4.4	新疆	3	1124	204	146	18	72
2019.4.7	西藏	1	/	/	55	/	/
	总计	121	323662	17478	8787	/	/

注:“/”表示数据不全

株全基因组序列同源率为99.95%左右,提示疫情可能来自俄罗斯和东欧疫情国家^[4]。

2.3 传染源

ASFV的传染源包括发病猪、隐性感染猪、带毒野猪和污染物以及软蜱等媒介吸血昆虫。ASFV的主要传播方式有3种:1)直接传播,通过健康猪与病猪或带毒野猪接触而感染,一旦ASFV在家猪群中存在,带毒猪就可能成为重要的传染源;2)间接传播,血液、排泄物以及污染的车辆、工具等能传播ASFV,猪采食污染的食物,或舔食污染物品而感染;3)媒介蜱传播,ASFV是目前发现唯一的DNA虫媒病毒,游走性钝缘蜱和非洲钝缘蜱等多种钝缘蜱能感染ASFV,并作为其保毒宿主和传播媒介。钝缘蜱的强大生命力和ASFV在其体内长时间存活是许多疫区反复发病,难以根除ASF的主要原因之一。

2.4 传播特性

有报道指出ASFV自身的传播能力不强,在同一猪舍内有的栏设猪发病死亡,而其它栏设的猪未见临床异常。ASFV在非洲的传播主要通过非洲野猪隐性带毒及软蜱叮咬。非洲野猪感染该病毒后有表现为隐性带毒,但由于病毒含量较低,需要通过虫媒软蜱才能向家猪传播。而欧洲的野猪对非洲猪瘟病毒易感,因而在欧洲感染猪与健康猪的接触是非洲猪瘟的主要传播途径。有研究表明,基于钝缘蜱的活动范围及其短时间吸饱血即脱离宿主,由此认为这些蜱对ASFV的长距离传播可能性很小,而感染生猪及其产品的移动是导致疫情快速远距离传播的主要途径。ASFV在未经高温处理的肉品中存活能力很强,未经高温处理的泔水、腌制猪肉制品、火腿等也是造成病毒跨区域传播的重要因素。历史上,多起跨境传播的ASF疫情均与轮船运输的污染泔水,航空器、火车运载污染的猪肉制品以及感染ASF野猪的移动有关^[5]。

3 诊断方法

3.1 临床症状

ASF感染潜伏期常见为3~15天,也可长达20多天,根据病情通常分为最急性型、急性型、亚急性型、慢性型。1)最急性型:病猪常无任何症状突然倒地死亡,死亡率高达100%,部分猪死前体温

升高,呼吸急促,皮肤充血,随即死亡;2)急性型:高热稽留、食欲废绝、耳和腹部等皮肤充血变紫,鼻腔出血、流产、腹泻等,6-13天死亡,有的到20天;3)亚急性型:症状比急性型轻,病程更长,感染后7-20天死亡,死亡率在30%-70%;4)慢性型:体重减轻、间歇热、呼吸症状、慢性皮肤糜烂、关节炎。耐过猪可长期带毒。另外,部分非洲野猪感染后无临床症状而作为保毒宿主。图2(图见第51页)来源^[6]:非洲猪瘟临床表现和剖检病变。

3.2 病理变化

ASF病猪剖检主要见:全身性多器官出血,其中脾脏极度出血肿大达正常的数倍,严重梗死为特征性病变,淋巴结出血肿胀明显,肾脏、肺脏、消化道黏膜和扁桃体等多处出血,心包和腹腔出血积液。图3(图见第51页)来源^[7-8]:我国首例非洲猪瘟的流行病学调查;江苏省首例非洲猪瘟的现场诊断。

3.3 病原学诊断

PCR检测具有简单快速、灵敏度高和特异性强的优点,是目前ASFV最常用的实验室检测方法,PCR技术的广泛应用及其适用性广使其成为世界各地实验室的常规方法,近年来研究人员建立了多种PCR法检测ASFV。常规PCR检测ASF,根据ASFV基因组高度保守区域如P72片段设计特异性引物,进行PCR扩增检测,具有良好的敏感性和特异性,是病毒早期感染的一种快速诊断方法。也有在常规PCR基础上发展出来的多种方法,1)多重RT-PCR方法,根据ASFV和CSFV的保守基因设计多对特异性引物,用于ASF临床病料的快速检测,同时也能鉴别诊断猪瘟(CSF),是临床快速特异诊断ASF和CSF的使用方法;2)荧光定量PCR方法,根据ASFV的保守基因设计一对引物和探针建立TaqMan实时荧光定量PCR,能特异性地检测ASF,或同时根据CSFV设计两对引物和探针建立双重荧光定量PCR,用于鉴别诊断ASF和CSF^[9-10];3)巢式PCR方法,根据ASFV的一段保守基因设计内外两对引物,进行递进式的两次PCR,具有比单次PCR更好的特异性和敏感性,是检测蜱感染ASFV的一种方法^[11];4)线性指数PCR方法,是不对称的单链扩增PCR方法,根据ASFV P72基因设计引物,运用该法直接进行扩增在终点读取荧光

值,通过溶解曲线分析验证靶基因的扩增,敏感性达到几个拷贝,是ASF诊断的一种新方法^[12];5)纳米PCR方法,利用纳米金颗粒作为热导介质,提高PCR反应效率,检测ASFV的敏感性比常规PCR更高^[13]。

等温扩增方法进入21世纪,核酸恒温扩增技术快速发展,这些技术在恒温条件下即可进行核酸扩增的新技术,通常具有高效、快速、无需特殊仪器辅助,适合基层检测应用等优点,因而被广泛应用。目前也有不少研究运用恒温扩增方法检测ASF,1)环介导恒温扩增(LAMP)技术,已有研究利用该技术,根据ASFV的P72基因保守区域设计了四条引物,建立起ASFV的LAMP快速检测方法,检测结果敏感特异,是适合应用于基层检测的新方法^[14];2)重组酶聚合酶扩增(RPA)方法,已有研究基于ASFV的P72基因保守序列设计引物,建立ASFV的RPA等温检测,是ASFV基层检测的一种可靠新技术^[15];3)交叉引物恒温扩增(CPA)技术,有研究在CPA技术的基础之上,对ASFV的P54基因序列保守区域设计引物和标记探针,CPA产物结果检测结合免疫层析试纸条检测显示,进一步简便检测过程,检测结果也同样具有高特异性和高敏感性^[16]。

探针杂交检测技术是在酶标板中可批量操作的检测方法,具有灵敏性高,有效弥补PCR出现非特异性结果的不足,无需电泳步骤等优点,但该技术难度大,对操作技术要求较高。已有研究根据ASFV P72基因序列分别设计一条5'生物素标记探针及3'烷硫基修饰探针,并将后者进一步制备成纳米金标记探针。检测时将PCR扩增产物与纳米金标记探针及生物素探针杂交,杂交产物在酶标板上进行信号放大,进而实现对ASFV的检测。

3.4 血清学诊断

酶联免疫吸附试验(ELISA)是诊断ASF的首选血清学方法,具有操作简便、特异性强和敏感性高等优点,适合批量样品检测而在国内外广泛应用。目前应用ELISA检测ASF的方法主要包括间接ELISA、固相ELISA、间接夹心ELISA和竞争ELISA。对于建立ELISA方法检测ASF的多样化,主要在于检测抗原/抗体的类别不同,其获得

方法也是关键点,1)检测抗原/抗体,国内外常用作ASF检测抗原的蛋白有VP73、VP72、P54、P32、P30以及ASF检测单抗P73、P72和P54;2)获得方法,有不少研究利用原核/真核表达方法获得重组蛋白作为检测抗原,也有利用昆虫细胞表达方法获得抗原蛋白;检测抗体则需要制备单克隆抗体^[17]。

荧光抗体检测是对抗体进行荧光标记,然后通过抗原抗体特异性结合,在荧光显微镜下显示结果的技术。1)荧光抗体试验(FAT)可用于病猪脾脏和淋巴结的组织压片和冰冻切片中的ASFV抗原检测。该方法具有敏感性好、特异性高等优点,但对试验操作有一定的技术要求,同时对设备和抗体要求高,因此仅作为ASFV的辅助检测方法。2)间接荧光抗体试验(IFA)可用于ASF病猪的血清检测,具有的优点是当ELISA检测结果不确定或难以建立ELISA检测时,可采用该方法。该技术的建立是人为的将ASFV感染细胞作为检测抗原固定到载玻片上,检测时使被检血清与载玻片上的抗原结合,将已结合的抗体与荧光素标记的猪免疫球蛋白抗体结合,结果在荧光显微镜下观察^[18]。

胶体金免疫层析(GICA)技术是目前快速发展的一项检测技术,具有操作简便、特异高,敏感性好,结果直观适合于基层应用等优点。目前已有研究,将ASFV的重组蛋白P54用胶体金标记后喷涂纤维垫,并分别以SPA和抗P54多克隆抗体作为检测线和质控线,制作了ASFV的P54抗体检测胶体金免疫层析试纸,检测结果特异性强、敏感性好^[19]。

4 防控措施与挑战

4.1 我国的主要防控措施

我国的非洲猪瘟疫情尽管仍有发生,但防控有效,总体可控,目前属于多点散发态势,没有出现大面积流行。目前我国疫情发生势头不断减弱,截止2019年4月12日,已有108个疫区按规定解除了封锁,21个省份恢复为非疫情省份。我国采取的一系列防控措施,主要概括为:1)领导迅速应对疫情,健全动物防疫制度;2)建设实施ASF全国五分区防控策略,联防联控同时保障生猪产业

市场供需平衡;3)强化疫病报告制度,对可疑和疑似疫情严格检测,果断封锁处理疫点疫区,落实染疫动物无害化处理工作,同时落实疫区和受威胁区措施;4)按养殖、交易和屠宰环节全覆盖检测排查疫情,全面加强生猪调运监管,实施区域化管理;5)强化消毒制度同时加强疫点疫区和受威胁区的野猪和虫媒防控;6)严禁泔水饲喂生猪,加强餐厨剩余物监管,针对性地切断泔水传播途径;7)建设兽医实验室疫病检测,完善疫病检疫追查系统。

4.2 我国当前的防控难点

1)我国公布的疫情,覆盖范围广阔,对控制病毒扩散和开展全国范围的ASF根除难度大;2)目前我国ASF疫情,已经确认传播途径过多,包括人员和运输工具带毒传播,ASFV污染泔水喂猪散毒,带毒生猪及其产品的调运传播,同时也还存在其他潜在的传播途径,其与不法行为结合进一步降低了针对性切断传播途径的效率;3)我国当前报道的疫情中,包括了两起野猪感染,带毒的野猪闯入对流行的疫区容易造成反复发病,阻碍该病净化;4)我国仍存在相当一部分生物安全防控水平低及以饲喂泔水养殖散户,增加了对该病控制的难度;5)目前我国周边的国家仍不断爆发流行ASF疫情,外部传入威胁压力大;6)对ASFV的基础研究滞后,制约疫苗开发,目前尚无有效疫苗使用。

4.3 ASF疫苗开发程度

ASF疫苗在上世纪60年代开始进行研究,尽管到目前仍未有商品化的疫苗投入使用,但包括灭活疫苗、减毒活苗、亚单位疫苗、核酸疫苗和病毒活载体疫苗在内的各个方向都有在不同程度的研究。

灭活疫苗 ASF 的灭活疫苗是最早开始研究的,但到目前仍未有有效保护的灭活苗研制成功。有研究通过配伍新型佐剂 Polygen™ 或 Emulsigen®-D 或改变病毒传代等方式,已开发出有高效价抗体的 ASF 灭活疫苗,但中和抗体低而不能对有效抵抗强毒株攻击,有待进一步发展^[20]。

减毒活苗 ASF 减毒活病毒株分为3类:传代致弱毒株、天然弱毒株和重组弱毒株。西班牙和葡萄牙曾在养殖线上使用传代弱毒株免疫猪只,由于毒力过强出现了肺炎,流产和死亡等临床症状而被迫放弃。也有研究将 ASFV 在异源细胞上传代至

毒力完全丧失,而其免疫猪只却不能抵抗 ASFV 强毒攻击^[21];天然弱毒株能对同源强毒入侵提供60%~100%的保护率,但也因其毒力作用强引起临床症状而制约实际生产使用;重组弱毒株,采用基因工程方法,对毒力基因如TK、UK、9GL和CD2v,或免疫逃逸基因如MGF和A238L进行敲除研制的ASF缺失弱毒株,目前研究结果显示能提供同源和异源保护作用,有的保护率甚至能达100%,但伴随较快的免疫逃逸和毒力残余是阻碍其推广应用的主要问题。

亚单位疫苗、核酸疫苗和病毒活载体疫苗这三种不同的疫苗都是对具有保护作用的一个或多个抗原基因脱离母毒,进行独立表达而起作用的疫苗。ASF亚单位疫苗是对P72、P54和P30等抗原独立表达,目前对猪只抵抗ASFV的免疫保护水平只能做到部分保护。ASF核酸疫苗是利用质粒的独立表达能力,直接在猪只体内表达ASF抗原,与亚单位疫苗相似目前主要问题仍是保护率低。ASFV活病毒载体疫苗,目前主要在诱导免疫应答方面研究。将ASFV保护性抗原基因(p72、p54、p30、CD2v、p12、EP153R)导入其他病毒基因组并在猪只体内表达,结果发现,免疫猪只可以产生ASFV特异性抗体和CTL反应,保护效率有待进一步研究。

5 结语

2018年8月,我国首次报道非洲猪瘟疫情,之后对我国养猪行业不断冲击,损失惨重。目前我国的ASF疫情流行覆盖面广,疫情仍个别散发,参考国外的经验,我国对ASF的控制、根除需要数年甚至更长的时间。因而我国需要做好长期应对的准备,对该病有更全面的认识,更深入的研究,制定针对性的防控措施,早日解决ASF对我国养猪业发展的制约。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业农村部. 我国非洲猪瘟疫情总体可控. [EB/OL]. http://www.moa.gov.cn/ztl/fzzwfk/gzdt/201812/t20181206_6164433.htm, 2018-12-06.
- [2] OIE. Information on aquatic and terrestrial animal diseases, African Swine Fever. [EB/OL]. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/information-on-aquatic-and-terrestrial-animal-diseases/african-swine-fever/reports-on-asf/>, 2019-01-09.

非洲猪瘟防控期间现场排查方法与建议

谭结敏

(佛山市高明区农业技术服务推广中心, 广东 佛山 528500)

摘要:非洲猪瘟防控期间,正确掌握非洲猪瘟现场排查的相关操作技术与方法,对一线的防疫人员来说至关重要。与此同时对疫病作正面宣传,正确引导群众以免引起不必要的恐慌,也是相关从业人员不能忽视的一项工作。笔者根据非洲猪瘟防控工作期间的一次现场排查实例,以期为防疫人员现场排查工作提供参考。

关键词:非洲猪瘟; 防控; 现场排查

中图分类号:S851.33 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)04-006-04

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病,发病率和死亡率可达100%。世界动物卫生组织(OIE)将其列为法定报告动物疫病,我国将其列为一类动物疫病^[1]。

2019年1月份期间新发疫情5起,疫情发生势头进一步趋缓。但由于非洲猪瘟传入和传播渠道多、潜伏期长,目前病毒在我国已形成了一定污染面,传统的生产、流通和消费方式难以短时间内根本改变,传播途径错综复杂,且全球范围内尚未研发出有效疫苗,防控形势仍复杂严峻。然而正确掌握非洲猪瘟现场排查的相关操作技术与方法,对一线的防疫成员来说至关重要。与此同时做好疫病的正面宣传,正确引导群众以免引起不必要的恐慌,也是相关从业人员不能忽视的一项工作^[2]。以下为笔者在防控工作期间的一次现场排查实例:

1 排查背景

2019年1月某日笔者与同事收到A镇动物防疫检疫站官方兽医信息上报,称某动物无害化处理公司的员工B将其在某规模养殖场收集多头死猪的工作视频上传到微信群,在这个非洲猪瘟防

控的敏感时期,造成一定的影响。为消除存在非洲猪瘟疫情的疑虑,笔者与同事共六人,汇同A镇的该片区官方兽医、村级防疫员组成排查小组到养殖场进行现场排查。

2 现场排查流程

2.1 出发前准备

将到场人员按要求准备好生物安全防护材料、血液和组织采样所需材料。其中生物安全防护用品和采样材料尽量为一次性使用、携带消毒剂(戊二醛癸甲溴铵溶液)、按消毒剂上使用说明,疫病发生时环境消毒1:800的比例稀释消毒水,装到喷壶备用。用1:2500稀释的消毒水对车辆进行彻底消毒,车内不放置无关物。车内、后尾箱都用一次性胶纸桌布铺垫。

2.2 抵达养殖场

场外停好车辆。穿戴好个人防护设备,做好个人消毒。携带相关用品准备入场。该养殖场有一定的养殖规模,地处远离村落、水源位置,有南向和东南向共两个出入场口,东南向场口用作生产区猪只进出使用。南向大门有消毒池,所有人员穿着水鞋趟过消毒池后步行约200米,到达办公室和生活区区域。

2.3 现场查看

2.3.1 养殖场四周建有围墙，办公生活区域可见环境干净，场内没其他自养动物。有独立的办公室和生活区域。40米开外有独立的饲料加工和存放仓库，门窗敞开，饲料用防水布遮盖。养殖生产区和尸体堆放区都不在视线范围内。

2.3.2 查看养殖场所有证件和养殖档案、防疫制度都齐备。养殖场工作人员按《佛山市高明区畜禽养殖场养殖档案》要求登记了包括生猪的进出苗数量、免疫程序、饲料配制、治疗用药情况、死淘数量、消毒记录等信息。但有部分内容不够详细，其中，每日死淘量的登记数并非按日登记，而按照某动物无害化处理公司收集死猪当日的总数(运输单据)作登记。

2.4 场内猪只健康检查

2.4.1 猪群的临床表现观察

两名排查人员在饲养员的带领下，沐浴更换场内衣服后到生产区内进行巡查，观看场内猪群的临床表现。随身携带的手机放到一次性透明密封袋中，方便拍摄，但不能取出来使用。(见图1)

经过询问场内养殖户场内的养殖讯息，仔细查看场内的猪群临床表现，可见环境干净，有做相应的消毒措施与记录，没有泔水喂养痕迹。场内种猪精神良好；大猪饲养密度合理，偶有几只外表有打斗后伤痕或眼眶黑污咳嗽离群外，其余大猪外观皮毛红亮，精神良好、均匀分散躺卧；部分小猪烦躁不安，可能天气寒冷原因，棚舍内环境过热，少量带有咳嗽症状；有部分哺乳仔猪及小猪有拉稀症状。养殖户均对有病态的猪进行标注与实施治疗。排查人员未发现非洲猪瘟或者其他急性传染病的症状。

2.4.2 死猪的解剖检查(见图2)

笔者等人携带采样所需物品跟随饲养员到死猪堆放处进行剖检。该位置离生活区域大概100米。有小猪8头、大猪2头共10头放置在干燥的混凝土地面上，饲养员指出这批死猪为前后共2天半的死淘量。猪只尸体表面已经喷洒了消毒液(戊二醛癸甲溴铵溶液)，并有防水布遮盖，尸体旁有化粪池。

初步检查，耳、鼻、腋下、尾和四肢等部位没呈界限明显的紫色斑或点状出血点等其他异样，口鼻处、四肢也没发现水泡或者溃疡。于是抽取三头

当日凌晨时段死亡的猪进行剖检，一头大猪，两头小猪。

大猪毛色乱，颈部以上较多划痕伤口，眼眶、耳根部更甚，眼结膜发绀，全身淋巴结肿大，腹腔只有少量渗出液，脾脏大小正常，呈深紫色，质地柔软；腹部内脏或肠系膜上表部分未见出血点；肺部病变，肺部肿大，为暗红色，按压切面有液体流出，喉头、气管有血色纤维素性渗出。

小猪体现消瘦，眼睑水肿；切开胸腹腔，可见纤维素性胸膜炎和腹膜炎，胸腔积液、少量腹水，肺部间质增宽，其中一头的肺部肿胀、与胸腔发生粘连。颌下淋巴结充血，腹股沟浅淋巴结水肿。脾脏轻微肿大，呈绛红或紫色，质地柔软；肠胃部有条絮状的伪膜覆盖在浆膜上；肠系膜淋巴结肿大；肝门处有片状淤血区域，肝叶边沿有淤血；呼吸道粘膜充血，支气管有泡沫状渗出液。



图1 尸体堆放处检查



图2 小猪解剖图

剖检完成后，将已剖开猪只丢进化粪池进行无害化处理，并喷洒已配制的消毒水做环境消毒。擦洗解剖工具，喷淋消毒水后放置到干净的

袋子中,过后再另用消毒水浸泡30分钟和高温灭菌处理。所有人换上新的鞋套并作全身消毒,离开死猪堆放区域。

2.5 排查结果

据现有资料显示,ASF猪主要以下典型症状:高热、呕吐、腹泻或便秘,有的便血,虚弱、难以站立,体表不同部位(尤其是耳、鼻、腹、臀部)皮肤呈红色、紫色或者蓝色,有的咳嗽、呼吸困难,母猪流产、产死胎或弱胎。出现上述临床症状后,一般2~10天内死亡^[3]。

ASF猪的剖检病变:皮肤黄染,皮下脂肪黄染,血液凝固不良;病死猪脾脏肿大,大小约为正常脾脏的4~5倍,呈紫褐色;肺部支气管有大量淡黄色渗出液;腹腔大量积液呈血红色;肾脏肿大,肾乳头肿大,见淡黄色胶冻样渗出;肠系膜/下颌淋巴结肿胀、出血;腹股沟淋巴结肿大、出血,呈紫褐色;淋巴结切面潮红,指压时有血液渗出;胃肠粘膜出血;心脏的心耳处有大量出血,心内膜见紫褐色出血斑;十二指肠、回肠、直肠出血,场内容物呈焦油色;膀胱内膜充血^[4]。

参照中国动物疫病预防控制中心编制的《非洲猪瘟现场排查手册》中的排查方法与流程,综合现场猪群的临床症状和解剖病理情况,可以初定解剖猪只致死原因为呼吸道疾病的继发感染,可排除该场为非洲猪瘟等烈性疫病场,所以不再做进一步的血液和组织病料的采集送检。

2.6 离场前准备工作

2.6.1 排查记录填写

排查过程中,该养殖场场内人员积极配合工作,没有存在慌张失措情况。排查人员按现场情况填写加盖公章的《佛山市动物养殖场(户)监督巡查记录》,要求受检单位负责人签名后交付其第二联记录表。巡查记录表填写内容为:养殖场有进行养殖备案,当前存栏4325头,有独立的饲料加工和存放仓库,没有泔水养殖历史,场内猪只自繁自养,规模符合动物防疫条件。按《佛山市高明区畜禽养殖场养殖档案》规定进行强制免疫,建立并规范填写,按规定佩戴牲畜耳标,落实消毒工作,对病死动物进行无害化处理,记录完整。有按规定申报产地检疫,建立动物防疫有关制度完整。

2.6.2 提出整改与建议

(1) 要求该养殖场做好饲料仓库管理,在非使用期间应做到关闭门窗,以防饲料霉变,苍蝇老鼠雀鸟等疫病传播媒介的滋生等问题导致成本的损耗。

(2) 养殖档案里死淘数量应该按天、按猪的大小填写,并写明死亡原因。清理出死淘猪后应及时联络动物无害化处理公司上门收集,死猪尸体存放时间过长会引起生物安全隐患,特别是夏天、阴雨等天气。化尸池做好安全防护措施,以防发生意外事故。

(3) 督促该养殖场继续做好消毒灭源工作。寒冷天气,应加强猪场养殖管理,及时免疫,注意通风,建议及时淘汰弱猪病猪,减少猪群患病率,特别是呼吸道疾病的感染。

2.6.3 虽然该养殖场经过现场情况初定为非ASF疑似感染场,但仍督促A镇的片区官方兽医和村级防疫员做好回访跟进处理,若发现有疑似死猪或临床症状应第一时间逐级上报。

2.6.4 离开养殖场前,对接触过养殖场的所有物品进行消毒处理;脱下鞋套、一次性防护服等物品放到垃圾袋中,让场内人员进行无害化处理。盛放物品的容器进行消毒后才能带走。清洗消毒水鞋后才能离开。

2.6.5 进入过生产区的两位排查人员需要沐浴更衣才能离开。所有人的手、眼镜必须用酒精消毒,用消毒湿巾抹擦脸部。

2.6.6 再一次用消毒水对车辆进行消毒。

以下为这次的排查流程图^[5]:

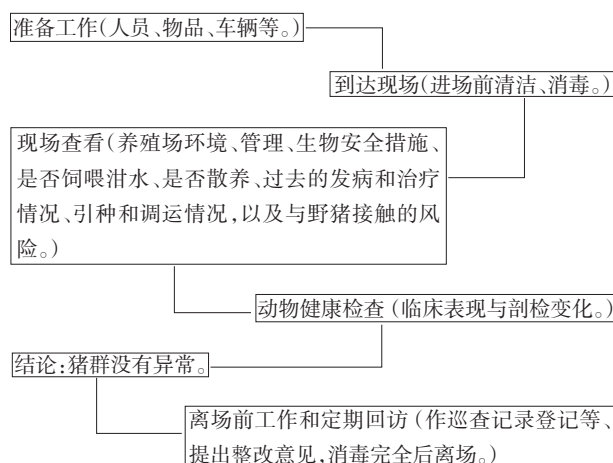


图3 排查流程图

3 事件处理

该场当前存栏 4325 头，而某动物无害化处理公司的员工 B 于 3 天前收集的大小死猪共 44 头，共 4 天的死淘量，死淘率接近 1%，属于合理范围。员工 B 未遵守行业规范将工作视频发放到微信群，造成一定的影响。经过此次的排查后，A 镇官方兽医已联系该公司，同时向其要求：1. 及时对全体员工进行工作操守的重点培训；2. 要求员工 B 对所作行为负责，勒令短时间内在有上传视频的微信群逐一澄清解释，避免过度转发引起社会恐慌。3. 若事件影响程度超出可控范围，将会对该员工 B 追究法律责任。

在这个非洲猪瘟防控的敏感时期，作为相关

从业人员，不应乱造谣、乱传谣，理应做好疫病的正面宣传，正确引导群众以免引起不必要的恐慌。

参考文献：

- [1] 贾良梁. 非洲猪瘟病毒特性和临床症状[J]. 国外畜牧学-猪与禽, 2018, 38(12):1-3.
- [2] 农村部. 非洲猪瘟疫情应急预案[Z]. (2017-9-20).
- [3] 农业部. 非洲猪瘟防治技术规范(试行)[Z]. (2015-11-24).
- [4] 陈昌海, 董永毅, 开妍, 等. 江苏省首例非洲猪瘟的现场诊断[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(9): 5-8.
- [5] 董浩, 李硕, 倪建强, 等. 非洲猪瘟现场排查手册[M]. 中国动物疫病预防控制中心: 中国动物疫病预防控制中组(2018-8-23):1.



《广东畜牧兽医科技》

(双月刊) ISSN 1005-8567
(1976年创刊, 大16开本, 正文52页) CN 44-1243/S

主管单位: 广东省农业科学院

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

定 价: 每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元(含平寄邮费)

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

电 话: 020-87576452

传 真: 020-87576452 E-mail: gdxmsykj@163.com

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

非洲猪瘟诊断方法研究进展

康桦华, 张春红, 刘志成, 张建峰, 孙俊颖, 沈海燕*

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

摘要:非洲猪瘟是一种急性、烈性、高度接触性传染病, 对全球养猪业危害严重。世界动物卫生组织将其列为法定呈报的动物疫病, 我国将其列为一类动物传染病, 此病目前无有效疫苗进行预防。本病已在非洲、欧洲和美洲等几十个国家暴发。2018年8月, 中国首次暴发非洲猪瘟疫情, 此后我国多地陆续发生非洲猪瘟疫情, 给我国的养猪业健康发展形成了巨大的威胁。本文概述了非洲猪瘟的诊断方法研究进展, 以期为我国开展非洲猪瘟的诊断和有效防控奠定基础 and 提供技术参考。

关键词:非洲猪瘟; 诊断方法; 研究进展

中图分类号:S851 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)04-0010-04

Advances in diagnostic methods of African Swine Fever

KANG Huahua, ZHANG Chunhong, LIU Zhicheng, ZHANG Jianfeng,
SUN Junying, SHEN Haiyan*

(Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock Disease Prevention, Guangzhou city, Guangdong province, 510640, China)

Abstract: African swine fever (ASF) is an acute, intense and highly contagious disease, which seriously harms the global pig industry. ASF has been listed as one of the notifiable terrestrial and aquatic animal diseases by OIE, and organized as "Class A animal disease" in the catalogue of animal epidemics of China. So far, there is no commercial ASFV vaccine. The continuous spread of the disease through Africa, Europe and the other countries keeps the neighboring countries on heightened alert. In August 2018, ASF emerged in China for the first time and subsequently rapidly spread across many regions of China, posing a major threat to the Chinese pig industry. This review summarizes the diagnostic research progress of ASF, which can provide technical reference for monitoring and comprehensive prevention and control of ASF.

Keywords: African swine fever; diagnostic methods; research progress

非洲猪瘟(African Swine Fever, ASF)是一种急性、热性、高度接触性传染病, 其病原是非洲猪瘟病毒(African Swine Fever Virus, ASFV), 该病毒可

感染野猪和家猪, 发病率和致死率高达100%, 被世界动物卫生组织列为法定报告的动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病^[1, 2]。ASFV是非洲猪瘟

收稿日期:2019-03-11

作者简介:康桦华(1979-), 女, 广东翁源人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物疫病防控工作。E-mail:534011491@qq.com

* 通讯作者:沈海燕(1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向:动物传染病学与免疫学。E-mail:haiyan_0001@163.com

病毒科(Asfarviridae)非洲猪瘟病毒属(Asfivirus)的唯一成员,是双股DNA病毒,具有囊膜,呈二十面体对称,平均直径200 nm。不同分离株的基因组大小不一,约在170~190 kb之间。ASFV基因组具有共价的闭合末端,而且在靠近发夹环的部位有重复序列和可变区^[3-4],基因组编码的酶和蛋白参与调节病毒与宿主的关系,对病毒复制和生存传播、以及持续性感染具有重要作用。软蜱是ASFV的自然宿主和传播媒介。感染ASFV的家猪、野猪、软蜱、猪肉及其制品、运输车辆、受污染的饲料等均为传染源^[5]。

ASF最早发生于肯尼亚,而后逐渐非洲、美洲和欧洲的多个国家都受到了该病的影响。2018年8月,中国首次爆发ASF疫情^[6],而后各地相继发生多起ASF,截至2019年3月23日,全国已有28省(区、市)发生ASF疫情,对我国养猪业的危害与日剧增,导致我国防控和消灭ASFV的形势十分严峻。目前没有有效的疫苗来预防ASF,疫情一旦发生,只能通过扑杀染疫动物,执行严格的卫生防疫措施控制疫情蔓延,因此该病很难根除和净化。因此,亟需敏感、快速、准确、和特异的ASFV检测方法,能更好地检测该病,从而控制该病。现就ASFV诊断方法进行综述,以期为加强我国ASF诊断技术的储备以及制定ASF防控措施提供技术参考。

ASF可分为最急性、急性、亚急性或隐性感染,而且ASF的临床症状并无明显特异性特征,且易与猪瘟、高致病性猪蓝耳病、猪丹毒、败血性沙门氏菌等疫病混淆,因此,不能仅仅根据临床表现就作出疑似ASF诊断,需要采用实验室手段来对该病进行确诊。目前常用的实验室诊断方法包括病毒分离培养、红细胞吸附试验、间接免疫荧光试验、血清学检测及病原的分子生物学检测等。

1 病毒分离培养

将疑似ASFV样品接种易感的猪源原代细胞、单核细胞或巨噬细胞,在出现红细胞吸附现象48-72小时后,若细胞发生病变(CPE),则说明检测样品中存在ASFV。

2 ASFV的红细胞吸附试验(HAD)

猪的红细胞能够吸附在感染ASFV的单核细胞

或巨噬细胞表面,因而在出现细胞病变(cytopathic effect, CPE)之前可形成特征性的玫瑰花环状^[7],即红细胞吸附试验(haemadsorption, HAD)。若没有发生红细胞吸附反应但有CPE出现时,可能是由于接种物的细胞毒性所致或其他病毒如伪狂犬病毒的感染,或者由不产生红细胞吸附反应的ASFV毒株导致。此时,必须采用其他的病毒学检测技术如FAT或PCR,检测细胞沉淀物是否存在ASFV。HAD试验耗时长(一般7~10天),对实验室要求较高,通常只有参考实验室采用该方法。

3 荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)

FAT使用异硫氰酸荧光素(FITC)结合的特异性抗体检测猪组织/细胞内ASFV抗原,但必须通过显微观察感染脏器涂片或薄层冷冻切片上的病毒抗原实现。FAT不但可以用于鉴定不产生HAD反应的ASFV毒株,而且可用于鉴别诊断由ASFV或其他病毒感染导致的CPE。FAT对急性ASF病例具快速、准确和经济的特点,但对亚急性和慢性病例的检出率较低,目前已逐步被PCR等方法取代。

4 血清学检测方法

目前常用于临床检测ASF的血清学方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、胶体金免疫层析(GICA)试纸条、免疫过氧化物酶染色技术等。OIE将ELISA作为诊断ASF的首选血清学方法,该方法具有操作简单、快速、敏感性高、特异性强、实验设备要求低的特点,而且适用于大批量样品的检测。研究者们相继针对ASFV的主要结构蛋白VP73、VP72、P30、pK205R、pB602L、p104R和P54等,建立了ASFV抗体ELISA检测方法,用于ASFV特异性抗体的早期检测^[8-12]。Giménez-Lirola等^[13]针对p30蛋白,建立的双基质间接ELISA方法,可用于检测猪血清与唾液中的ASFV抗体。胶体金免疫层析技术具有精确、快速、特异、高效、便捷等特点,较适用于基层和现场快速检测。吴海涛^[14]根据双抗体夹心法原理,将纯化后的抗ASFV单克隆抗体制备金标抗体,建立了用于检测ASFV的胶体金免疫层析试纸条方法。Sastre等^[15]建立了一种针对ASFV VP72蛋白的测流免疫层析试验

方法,通过使用病毒重组蛋白或灭活病毒进行的对比实验,表明该方法效果良好,与市场上现有的商品 ELISA 试剂盒的灵敏度相当。在 2018 年非洲猪瘟在我国爆发后, Gao 等^[16]建立了交叉引物扩增结合免疫层析条(CPA-strip)快速检测 ASFV 的方法,该方检测限可达 200 拷贝。该方法检测速度快,灵敏度高、特异性强,无需特殊设备仪器,简便易行,成本低,适合用于现场检测。

Pan 等^[17]建立了可对 ASFV 抗原定量分析的免疫过氧化物酶染色技术。Pastor 等^[18]针对 CS-P 抗原,建立了敏感性与 OIE 推荐的 ELISA 方法相当的斑点免疫(DIA)检测方法。Marco 等^[19]针对临床上症状不明显的病例,建立的免疫组化法,可以用来检测急性感染 ASFV 猪的扁桃体组织病理学变化,该方法可作为 ASFV 的辅助检测方法。林彦星等^[20]建立了一种以量子点作为标记材料的免疫层析试纸条,可快速检测 ASFV 抗体,与进口试剂盒相比,对临床样品的检测符合率为 100%,可用于 ASFV 快速检测和流行病学检查。

5 分子生物学检测方法

5.1 PCR

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是目前 ASFV 最常用的实验室检测方法。研究者对 ASFV 早期感染的快速诊断,建立了针对 ASFV VP72 基因的 PCR 检测方法,可以检测出极低含量的 ASFV^[21, 22]。另有研究者以纳米金颗粒作为热导介子,建立了比常规 PCR 检测技术敏感 1,000 倍以上的纳米 PCR,最低检出核酸拷贝数量可以达到 10 个拷贝^[23]。另外,研究者们建立的多重 RT-PCR 方法,可以通过检测临床样品(如抗凝全血、细胞培养物和组织),特异性诊断 ASF,鉴别诊断 CSFV、ASFV、PCV2、PRRSV 和 PPV5 种病毒的感染^[24-26]。随着技术的发展,研究者们建立了比常规 PCR 具有更高敏感性和特异性的实时荧光定量 PCR,已成为病原体检测的重要方法。目前用于检测 ASFV 的实时荧光定量 PCR 方法,主要是根据 ASFV VP72、VP73、P54、K205R 设计引物和探针进行检测^[27-29]。另有研究者,建立了双重荧光定量 PCR,只需一步即可做出 CSFV 和 ASFV,以及 ASFV 和 HP-PRRSV 两种病毒的鉴别

诊断^[30, 31]。

5.2 重组酶聚合酶扩增 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) 技术

RPA 是新型核酸检测技术,其灵敏度高、特异性强、反应时间短、检测成本低、所需仪器简单、结果确实可靠等。王建昌等^[32]基于 ASFV VP72 基因建立了 ASFV RPA 等温检测方法。李林等^[33]针对 ASFV B646L 基因保守区域,设计并合成了特异性引物和 exo 探针,建立了检测 ASFV 的实时荧光 RPA 方法。该方法只需 20 min 就可以完成检测过程,最低可检测到 16 拷贝/反应,而且有很好的灵敏度和特异性。RPA 在临床鉴别诊断、检验检疫和病原监测等方面具有广泛的应用价值。

5.3 线性指数聚合酶链式反应(LATE-PCR)技术

LATE-PCR 是一种不对称 PCR。Ronish 等^[34](2011)基于 ASFV VP72 基因建立了 LATE-PCR 方法,该方法可检测组织样品中的病毒,敏感性可达大约 1 拷贝的病毒 DNA,为 ASFV 的实验室诊断提供了有力手段。

5.4 环介导恒温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术

LAMP 技术是在恒温条件下即可完成的核酸扩增方法,操作简单、不需要特殊仪器设备,可在短时间内肉眼判读结果,可以满足基层兽医实验室和养殖场临床快速诊断的需要。研究者们先后针对 ASFV VP72 和 K205R 基因,建立了检测 ASFV 的快速方法-LAMP,最低可检测 10 拷贝质粒 DNA^[35, 36]。

5.5 探针杂交技术

探针杂交技术因其具有灵敏度高等特点,不仅可以有效排除 PCR 检测中的非特异性结果,而且可在酶标板中进行迅速、大批量反应,为 ASFV 核酸检测提供了新的方法,但该方法操作较繁琐,对试验人员技术水平要求较高。张鑫宇等^[37]针对 ASFV VP72 基因合成了 1 条 5' 生物素标记及 3' 烷硫基修饰的与保守区域互补的短链寡核苷酸探针,制备了纳米金标记探针,建立了检测 ASFV VP72 基因的纳米金探针杂交方法。

随着我国首例 ASF 的发生,ASF 疫情在我国跨区域,呈现多地发病态势,对我国生猪产业造成很大损失。党中央国务院高度重视,各地各部门迅

速行动,疫情得到有效控制,但仍有零星散发。目前尚无有效的治疗 ASF 方法,也无有效的疫苗预防,只能采取综合防控措施,做好生物安全防控,对病猪进行扑杀和无害化处理,各养猪场做好日常消毒工作,做到早发现、早确诊,并制定相应的防控措施。目前,对 ASFV 的生物特性和分子特性研究还不够深入,对 ASFV 的蛋白功能尚未有所解析。ASFV 防控工作任重道远,因此,作为研究者,一方面需要加大基础研究,早日揭示 ASFV 的致病机制,研制出有效的保护性疫苗;另一方面,针对目前 ASF 的严峻形势,需要深入开展 ASFV 病原学研究,加强高效、敏感、特异的诊断技术研究储备,加强对 ASF 流行和传播的监测,建立快速、有效的病原学诊断方法,对我国非洲猪瘟的诊断和有效防控具有十分重要意义。

参考文献

- [1] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. Chapter 2.8.1 African swine fever [EB/OL]. (2017 - 05 - 22). http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf.
- [2] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告 1125 号 [EB/OL]. (2008-12-23). http://www.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/200812/t20081223_1194404.htm.
- [3] CHAPMAN D, TCHEREPANOV V, UPTON C, et al. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89:397-408.
- [4] VILLIERS E, GALLARDO C, ARIAS M, et al. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences [J]. *Virology*, 2010, 400(1):128-136.
- [5] 刘建, 吴绍强, 唐慧林. 蝉对非洲猪瘟传播作用的研究进展 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2009, 20(2), 175-177.
- [6] 陈腾, 张守峰, 周鑫韬, 等. 我国首次非洲猪瘟疫情的发现和流行分析 [J]. *中国兽医学报*, 38(9):1831-1832.
- [7] MALMQUIST W A, HAY D. Haemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures [J]. *Am J Vet Res*, 1960, 21(21):104-108.
- [8] PEREZ - FILGUEIRA D M, GONZALEZ - CAMACHO F, Gallardo C, et al. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia* larvae [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9):3114-3121.
- [9] GALLARDO C, REIS A L, KALEMA - ZIKUSOKA G, et al. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16:1012-1020.
- [10] 朱红. 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白单克隆抗体的制备及抗体检测方法建立 [D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2007.
- [11] 靳雯雯. 非洲猪瘟病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立及其杆状病毒载体疫苗的构建 [D]. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [12] 梁云浩, 曹琛福, 陶虹, 等. 非洲猪瘟病毒 P54 蛋白的真核表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2014, 44(4): 373-378.
- [13] GIMÉNEZ-LIROLA L G, MUR L, RIVERA B, et al. (2016) Detection of African Swine Fever Virus Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens Using a Recombinant Protein 30 (p30) Dual Matrix Indirect ELISA. *PLoS ONE* 11 (9): e0161230.
- [14] 吴海涛. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制 [D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [15] SASTRE P, GALLARDO C. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood [J]. *BMC Veterinary Research* (2016) 12:206.
- [16] GAO Y, QIU H J. Cross-priming amplification combined with immunochromatographic strip for rapid on-site detection of African swine fever virus. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 274 (2018) 304-309.
- [17] PAN I C, SHIMIZU M, HESS W R. African swine fever, microplaque assay by an immunoperoxidase method [J]. *Am J Vet Res*, 1978, 39(3):491-497.
- [18] PASTOR M J, ARIAS M, ALCARAZ C, et al. A sensitive dot immunobinding assay for serodiagnosis of African swine fever virus with application in field conditions [J]. *Vet Diagn Invest*, 1992, 4:254-257.
- [19] MARCO M F D, SALGUERO F J, BAUTISTA M J, et al. An immunohistochemical study of the tonsils in pigs with acute African swine fever virus infection [J]. *Res Vet Sci*, 2007, 83(2):198-203.
- [20] LIN Y X, CAO C F, ZHANG C H, et al. Establishment of a quantum dots-based immunochromatographic strip for detection of the antibodies against African swine fever virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(10):1214-1220.
- [21] AGUERO M, FERNANDEZ J, ROMERO L, et al. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(9): 4431-4434.
- [22] 曾少灵, 花群义, 张彩虹, 等. 非洲猪瘟病毒 PCR 检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30(10):6-10.
- [23] 崔尚金, 胡泉博, 刘业兵. 非洲猪瘟病毒高效纳米 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(10):807-809.
- [24] 张倩. 非洲猪瘟病毒和古典猪瘟病毒双重 PCR 及双重荧光 PCR 检测方法的建立与应用 [D]. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2010.

鹤鹑羽色性状分子遗传机制研究进展

何艺平¹²³, 马荆鄂²³, 贡继尚²³, 杨艳北²³, 李袁飞²³, 饶友生²³, 孙旭初⁴, 许继国^{23*}

- (1. 广州市畜牧科学研究所, 广东 广州 510550;
2. 南昌师范学院生物技术研究所, 江西 南昌 330022;
3. 江西省地方鸡种遗传改良重点实验室, 江西 南昌, 330022;
4. 江西省恒衍禽业有限公司, 江西 丰城 331100)

摘要:鹤鹑羽色表型变异丰富, 繁殖周期短且产蛋率高, 是遗传学上难得的研究材料。在鹤鹑羽色性状的分子遗传机制研究方面, 国内外已开展大量研究, 并取得丰硕成果。本文综合了鹤鹑羽色性状分子遗传机制研究进展, 分析了相关研究结果对其它脊椎动物尤其是鸟类的毛色研究的参考指导意义, 为下一步产业中对鹤鹑羽色性状开展分子育种(比如羽色自别雌雄配套系的分子选育)提供参考材料。

关键词:鹤鹑; 羽色; 分子遗传机制

中图分类号:S813.25 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)04-0014-04

鹤鹑具有繁殖周期短、产蛋率高、毛色变异丰富等特点, 是研究基因型和表型关系不可多得的遗传材料。鹤鹑羽色种类繁多, 生物化学和组织学角度将羽色分为有色羽和无色羽两类, 有色羽从淡黄色到深黑色均有。关于鹤鹑羽色的研究, 以对日本鹤鹑羽色研究最为详细, 1979年日本科学家Truax详细报道了日本鹤鹑的羽色变型。羽色相关等位基因多呈现显隐性关系, 少数表现为等显性或不完全显性; 另外, 还有具有致死和半致死效应的基因座, 如黄羽、白羽和孵化黑羽等相关基因座。随着分子遗传学的发展, 众多经典遗传学研究过的基因座位已经在分子层面找到相对应基因甚至致因突变。这些突变的鉴定无论对于鹤鹑的分子育种还是基础研究都具有重要的意义。本文主要总结了鹤鹑羽色性状相关的分子遗传学研究成果。

1 伴性遗传表型

截止目前, 已报道的伴性羽色基因座有3个-白化基因座(albinism, *AL*)、隐性白羽基因座(blue,

B)和褐色基因座(brow, *BR*)。

1.1 白化基因座(*AL*)

银色羽最先是由Lauber于1964年首次报道, 通过正反交试验发现了呈现伴性遗传的银色羽基因。之后经Minvielle进一步证实^[1-2]。

银色羽基因座位包括三个等位基因, 其显隐性关系为: $AL*N > AL*C > AL*A$, 依次对应的表型为: 野生型、浅黄褐色和不完全白化(图1, 图见第51页)。 *AL*C*较之野生型个体, 其眼睛是红色的并伴随低水平的黑色素沉积, 随着年龄的增长眼睛颜色变深; 银色羽等位基因不改变羽毛的花纹, 只是导致褐色色素部分颜色变淡。 *AL*A*个体出雏时眼睛为明亮的粉红色, 毛色是黄到白, 成年后其毛色主要为白色, 但是头部到肩部有浅浅的奶油色^[3]。

2007年, Ulrika等用不同基因型的公鸡(*S*S*, *S*N*, or *S*AL*)与母鹑(*AL*N* or *AL*A*)杂交, 结果显示两个基因座位是直系同源的, 即鹤鹑的 *AL* 基因座对应鸡上的银色羽基因座。通过对候选基因鹤鹑 *SLC45A2* 进行测序分析, 发现 *Ala72Asp* 是浅褐

收稿日期: 2019-07-31

基金资助: 江西省教育厅科技项目(GJJ181080); 南昌师范学院启动基金; 南昌师范学院“11531”工程建设项目

作者简介: 何艺平(1982-), 女, 山西沁水人, 硕士, 畜牧师, 主要从事动物分子数量遗传育种研究。E-mail: 378518276@qq.com

*通讯作者: 许继国(1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 家禽分子遗传育种。E-mail: 3425614@qq.com

色表型的致因突变,外显子4上的剪接位点突变导致的外显子4缺失是导致白化表型的直接原因。

1.2 隐性白羽基因座(B)

控制银色羽表型(silver)的等位基因B呈现半显性遗传,其纯合子(B/B)个体表现为全身白色,其杂合子个体表现为全身灰色(图2,图见第51页)^[4]。2010年,Francis确认了银色羽等位基因B对应的基因为MITF,该基因外显子11上的2 bp的缺失导致了银色羽表型^[5]。除了对毛色有效应外,研究显示B/B基因型个体较之野生型个体发育迟缓,但是杂合子(B/+)个体与野生型个体无差别。另外,B/B个体的腹部脂肪显著高于野生型个体(+/+),胸肌重量和心脏大小也显著低于野生型个体^[5]。

1.3 褐色羽基因座(BR)

BR基因座上有两个等位基因^[6],包括BR*R(brown)和BR*R(roux),呈伴性隐性遗传。该等位基因不改变羽毛的花纹,只对真黑素的合成起作用,导致对应沉积真黑素的部位颜色变浅^[7]。不同基因型对应表型见图3(图见第51页)。Nadeau研究结果显示TYRP1基因上的Phe282Ser突变为BR*R对应的致因突变^[7]。

2 常染色体遗传表型

2.1 黄色羽(Yellow,Y)基因座

Y基因座位上存在4个等位基因,包括野生型Y*Y+、fawn、fawn-2/beige(Y*F2)、Y*Y和Y*RB。上述等位基因的显隐性关系为:Y*F2>Y*F>Y*Y+>Y*N>Y*RB^[8]。

黄色突变体是常染色体的不完全显性性状,其杂合子表型为小麦色(Y+),该等位基因可导致脂肪沉积增加,其纯合子(Y/Y)可导致胚胎早期致死;fawn-2突变体成年公鹑表现为浅棕色,母鹑表现为奶油色(图4,图见第51页);隐性黑个体出雏时背部和头部的羽毛为黑色,末梢为棕色,脸部和喉咙部位为奶酪黄色,腹部是灰色和米黄色的混合颜色,喙和腿是深色的,但是一些脚趾是黄色的(图5,图见第51页)。当鸟类成熟时,雄性和雌性都有色素沉着,背部和腹部表面的羽毛外观基本相似,背羽花纹与野生型相似,但没有麦秆色轴系。另外就是一些个体在上喙和下喙交界处以及下喙下的

咽喉处有一小块白色羽毛^[9-11]。

Annie等(2019)研究发现与Y等位基因对应的突变为ASIP基因上一段141162 bp的缺失,fawn2等位基因对应一段71 kb长度的串联重复^[11];Y*RB等位基因对应的致因突变为ASIP基因上一段8 bp的缺失(c.373-380del)^[8]。

2.2 薰衣草羽(Lavender,Lav)基因座

日本鹤鹑的薰衣草羽色是呈现常染色体隐性遗传,受Lav等位基因控制。该等位基因可导致真黑素和嗜黑素沉着障碍,但是不改变羽毛的花纹(图6,图见第51页)。此外,薰衣草对应的突变还影响个体的新陈代谢和体温调节,薰衣草个体相对于野生型体重更轻、体温更低、饲料转化效率和剩余饲料消耗更高^[12]。在2012年,Bertrand等^[13]发现包含MLPH基因在内的一段复杂的突变(两段倒位+一段缺失)是Lav表型的致因突变。

2.3 斑点(Spot,S)基因座

熊猫羽色(panda plumage colour)是由常染色体隐性等位基因(S)控制,其表型表现为全身白色背脊上点缀野生型毛色(图7B)。1日龄其绒毛表现为奶油色头部、背部和尾部并伴有褐色斑点,随着日龄的增加奶油色部分变为白色,褐色部分变为野生型羽色(图7A),之后不再变化。与其在同一基因座位上的等位基因是Sdw,与s控制的表型相似,只是其背部没有色素沉积^[14](图7C)。2006年,Miwa等确认EDNRB2基因上的c.995G>A突变对应S等位基因^[14]。

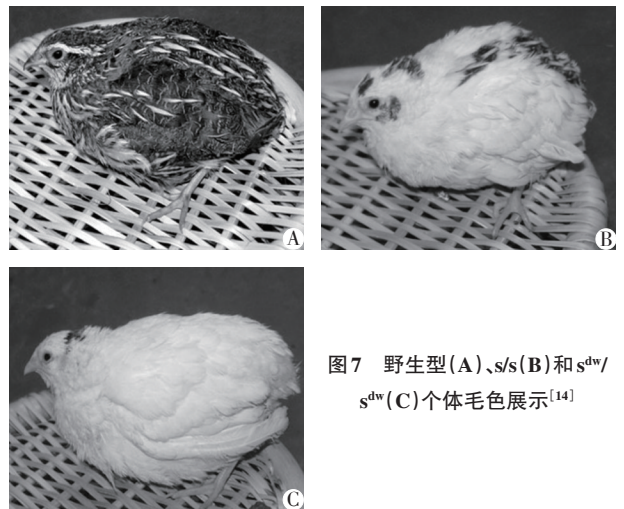


图7 野生型(A)、s/s(B)和s^{dw}/s^{dw}(C)个体毛色展示^[14]

2.4 淡黄色 (Yellowish, *yw*) 基因座

淡黄色呈现常染色体隐性遗传。其与野生型毛色相比,花纹相同但是呈现较淡的黄色(图8, 图见第52页)。由背部和胸部的羽毛颜色来看,两者都可以观察到深色区域,但是淡黄色个体的羽毛颜色较浅,且花纹没有野生型的清晰^[15]。2018年, Satoshi 等利用候选基因的方法研究了 *PMEL* 基因变异与 *yw* 表型的关系,结果显示 *PMEL* 基因的 Trp149*突变是 *yw* 表型的致因突变^[15]。

3 展望

羽色分子标记辅助选择在鹤鹑的育种中大有可为。国内关于鹤鹑羽色研究材料大多是朝鲜鹤鹑,多集中在探索遗传规律以及生产应用方面(羽色自别雌雄),分子机制层面研究较少^[12, 16-23]。因此涉及的相似表型是否与以上等位基因对应表型相同需要进一步验证。文献查阅过程中,很少有鹤鹑羽色相关性状的分子标记辅助选择的报道。

目前,我国存栏鹤鹑6亿只左右,其中蛋鹤鹑约4.2亿只,肉鹤鹑约1.8亿只,约占全世界的五分之一,已成为世界鹤鹑养殖第一大国。我国也已经有了第一个通过国家品种审定的鹤鹑品种-神丹1号。随着鹤鹑产业的不断扩大,以及鹤鹑育种体系的不断专业化,相信鹤鹑羽色性状分子标记辅助选择在鹤鹑的精准育种方面将大有可为。

鹤鹑作为遗传学科材料还有潜力待挖掘。鹤鹑广泛分布于欧洲、非洲和亚洲,在澳洲和北美洲部分地方也有分布。广泛的分布为研究进化和气候适应等提供了良好的先天材料条件。鹤鹑的形态学和行为学变异也异常地丰富,商业化的鹤鹑经过了严格的人工选择后,分为肉用和蛋用鹤鹑,另外还有观赏用的鸣鹤等,这为研究鹤鹑的生长、繁殖和行为等复杂性状提供了良好的机会。与其它家养动物比,鹤鹑繁殖周期短和产蛋率高的特性也是其它家养动物难以比拟的优势。

参考文献

- [1] MINVIELLE F, ITO S, WAKASUGI N, et al. Genetic analyses of plumage color mutations on the Z chromosome of Japanese quail[J]. Journal of Heredity, 2000, 91: 499-501.
- [2] LAUBER J K. Sex-linked albinism in the Japanese quail[J]. Science, 1964, 146: 948-950.
- [3] GUNNARSSON U, HELLSTRÖM ANDERS R, MINVIELLE F, et al. Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail[J]. Genetics, 2007, 175(2): 867-77.
- [4] HOMMA K. Studies on silver-feathered Japanese quail[J]. Jpn J Zootech Sci, 1969, 40: 129-130.
- [5] MINVIELLE F, BED'HOM B, COVILLE J, et al. The "silver" Japanese quail and the *MITF* gene: causal mutation, associated traits and homology with the "blue" chicken plumage[J]. BMC genetics, 2010, 11(1): 15-15.
- [6] MINVIELLE F, ITO S, INOUE - MURAYAMA M, et al. Genetic analyses of plumage color mutations on the Z chromosome of Japanese quail[J]. Journal of Heredity, 2000, 91: 499-501.
- [7] NADEAU N. Association of a single-nucleotide substitution in *TYRP1* with roux in Japanese quail (*Coturnix japonica*) [J]. Anim Genet, 2007, 38(6): 609-613.
- [8] HIRAGAKI T, INOUE - MURAYAMA M, MIWA M, et al. Recessive black is allelic to the yellow plumage locus in Japanese quail and associated with a frameshift deletion in the *ASIP* gene[J]. Genetics, 2008, 178(2): 771-775.
- [9] FUJIWARA A. "Recessive black": a plumage color mutant in Japanese quail [J]. The Journal of Poultry Science, 2005, 42(1): 64-69.
- [10] NADEAU N J, MINVIELLE F, ITO S, et al. Characterization of Japanese Quail yellow as a Genomic Deletion Upstream of the Avian Homolog of the Mammalian *ASIP* (agouti) Gene [J]. Genetics, 2008, 178(2): 777-786.
- [11] ROBIC A, MORISSON M, LEROUX S, et al. Two new structural mutations in the 5' region of the *ASIP* gene cause diluted feather color phenotypes in Japanese quail[J]. Genet Sel Evol, 2019, 51(1): 12.
- [12] 于美琴. 蛋用黑羽鹤鹑突变体的遗传机制及其种质特性的研究[D]. 硕士学位论文. 河南洛阳: 河南科技大学, 2010.
- [13] BED'HOM B. The lavender plumage colour in Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of *MLPH* that is related to differences in growth, feed consumption and body temperature[J]. BMC genomics, 2012, 13(1): 442-442.
- [14] MIWA M, INOUE M, AOKI H, et al. Endothelin receptor B2 (*EDNRB2*) is associated with the panda plumage colour mutation in Japanese quail[J]. Animal Genetics, 2007, 38(2): 103-108.
- [15] ISHISHITA S, TAKAHASHI M, YAMAGUCHI K A, et al. Nonsense mutation in *PMEL* is associated with yellowish plumage colour phenotype in Japanese quail [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 16732.
- [16] 许华伟. 朝鲜鹤鹑 *MC1R* 基因克隆及其在不同羽色个体中表达水平的研究[D]. 硕士学位论文. 洛阳: 河南科技大学, 2012.

- [17] 庞有志, 宋东亮, 陈家友, 等. 蛋用鹤鹑伴性羽色基因互作与连锁的关系[J]. 遗传, 2001(04): 309-316.
- [18] 杜金平, 申杰, 皮劲松, 等. 蛋用鹤鹑黄羽系选育研究[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(6): 960-962.
- [19] 申杰, 杜金平, 皮劲松, 等. 蛋用鹤鹑栗羽系的选育[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13641-13642, 13645.
- [20] 庞有志, 宋东亮. 蛋用鹤鹑自别雌雄配套系生产的遗传基础[J]. 中国家禽, 2001(06): 36-37.
- [21] 杨帅, 白俊艳, 吴胜军, 等. 黑羽鹤鹑种质特性研究进展[J]. 现代农业科技, 2016(22): 240-241.
- [22] 慎伟杰, 黄大桥, 刘梅, 等. 隐性白羽鹤鹑伴性遗传的发现与研究[J]. 中国家禽, 1988(03): 20-21.
- [23] 程端仪, 林其, 慎伟杰, 等. 隐性白羽鹤鹑的发现及其应用研究[J]. 遗传, 1992(04): 23-25.

上接第5页

- [3] 中华人民共和国农业农村部. 疫情信息.[EB/OL]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/fzzwfk/yqxx/>, 2018-08-03/2019-01-08.
- [4] 农业农村部关于非洲猪瘟防控工作有关情况答记者问[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(12):6-8.
- [5] 张志, 康京丽, 李晓成. 非洲猪瘟的流行特征和传播路线[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(11):48-51.
- [6] 非洲猪瘟临床表现和剖检病变[J]. 中国畜牧业, 2018(22): 70-71.
- [7] 魏澍, 段亚良, 李树博, 等. 我国首例非洲猪瘟的流行病学调查[J]. 现代畜牧兽医, 2018(10):48-50.
- [8] 陈昌海, 董永毅, 开妍, 等. 江苏省首例非洲猪瘟的现场诊断[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(09):5-8.
- [9] 陈静静, 罗宝正, 沙才华. 多重荧光 PCR 鉴别诊断猪瘟病毒和非洲猪瘟病毒[J]. 湖北畜牧兽医, 2012, 9(2):4-6.
- [10] FERNÁNDEZ-PINERO J, GALLARDO C, ELIZALDE M, et al. Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2012, 60(1) :48-58.
- [11] BASTO A P, PORTUGAL R S, NIX R J, et al. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus* [J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(4):819-826.
- [12] B RONISH, M HAKHVERDYAN, K STÅHL, et al. Design and verification of a highly reliable Linear - After - The - Exponential PCR (LATE - PCR) assay for the detection of African swine fever virus [J]. *Journal of VirologicalMethods*, 2011, 172(1):8-15.
- [13] 崔尚金, 胡泉博, 刘业兵. 非洲猪瘟病毒高效纳米 PCR 检测方法建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(10):807-809.
- [14] 非洲猪瘟病毒环介导恒温扩增快速检测技术的建立及应用[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 19(4):7-12.
- [15] 王建昌, 王金凤, 刘立兵, 等. 非洲猪瘟病毒 RPA 等温检测方法建立[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(7):78-81.
- [16] GAO Y, MENG X Y, ZHANG H W, et al. Cross - priming amplification combined with immunochromatographic strip for rapid on-site detection of African swine fever virus [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 274:304-309.
- [17] VIDAL M I, STIENE M, HENKEL J, et al. A solid - phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever virus antigen and antibody [J]. *Journal of Hygiene*, 1979, 83(02):363.
- [18] PAN I C, TRAUTMAN R, HESS W R, et al. African swine fever: comparison of four serotests on porcine serums in Spain [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1974, 35(6):787.
- [19] 张鑫宇, 左伟勇, 朱善元, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗体胶体金试纸检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(4): 281-285.
- [20] BLOME S, GABRIEL C, BEER M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation[J]. *Vaccine*, 2014, 32(31):3879-3882.
- [21] KRUG P W, HOLINKA L G, O'DONNELL V, et al. The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome [J]. *Journal of Virology*, 2014, 89(4):2324-2332.

基于用户有效信息行为的学科服务实践探索

张琴¹, 董尚智²

(1. 华南农业大学图书馆, 广东 广州 510642;

2. 广东省珠海市现代农业发展中心, 广东 珠海 519000)

摘要: 本文利用问卷调查和引文分析法分析了华南农业大学预防兽医学专业用户的有效信息行为: 用户常用的文献类型和检索工具, 文献数量、期刊文献的出版年、期刊数以及引用频次较高的期刊。在此基础上, 设计嵌入专业课程教学及培训内容, 强化兼职学科馆员服务小组管理, 并对学科资源进行优化, 为师生教学科研以及预防兽医学学科建设与发展提供保障。

关键词: 学科服务; 预防兽医学; 信息行为

中图分类号: S8-05 **文献标识码:** C **文章编码:** 1005-8567(2019)04-0018-04

1 引言

开展学科服务是国内外众多高校图书馆在服务创新方面的最大亮点之一。目前, 国内各高校图书馆的学科服务都处于探索期, 没有成熟的模式或机制, 并且各高校图书馆的实际情况各异, 这都需要学科馆员不断地尝试、探索和实践。了解用户信息行为, 挖掘用户信息需求, 根据学科特性, 创制符合读者需求的学科服务模式, 是针对性地开展学科服务的有效途径。

近几年来, 国内多所高校和科研院所通过研究用户信息行为, 探索开展学科服务的新路, 主要包括清华大学^[1]、复旦大学^[2]、北京师范大学^[3]、广西科技大学^[4]、天津工业大学^[5]、中国社会科学院^[6]、首都医科大学^[7]、湖北中医药大学^[8]等。由于专业不同, 用户信息行为特点存在差异, 本文利用问卷调查和引文分析法, 研究华南农业大学预防兽医学用户在科研教学过程中的有效信息行为, 以此了解用户需求, 有针对性地开展学科服务。

2 利用问卷调查分析有效信息行为

2.1 问卷调查方案的设计

采用自行设计的《预防兽医学师生咨询问卷》开展调查, 现场调查和网络在线调查相结合。现场调查主要是在兽医学院2017届毕业生到图书馆办理离校手续时开展, 网络调查则通过问卷星进行。问卷调查分为7道题目, 主要针对预防兽医学教学科研人员的信息行为及信息需求特征展开。共回收有效问卷76份, 其中研究生34份(博士生11份, 硕士生23份), 教师33份(教授8份, 副教授16份, 讲师6份, 助教3份)。

2.2 问卷调查的结论

(1) 在预防兽医学教研人员中, 使用文献类型最多是科技期刊、其次分别是学位论文、图书和专利、标准。科研人员(教师和研究生)使用这些文献的综合比例分别是94.8%、82%、34.3%、33.4%、29.2%。

(2) 对于图书馆购买的中文数据库, CNKI的使用频率最大, 其次是万方数据库和维普数据库, 这与本馆购买的数据库实际情况有所出入, 事实上

收稿日期: 2019-04-04

项目来源: 2016年度广东省高等教育教学改革项目“MOOC环境下大学生信息素养自主学习的实践研究”(粤教高函[2016]236号文, 项目编号: 104); 华南农业大学2016年度教改重点项目“MOOC环境下大学生信息素养自主学习的实践研究”(项目编号: JG16014); 华南农业大学2018年度教改重点项目“嵌入式信息素质教育课程教学效果评价研究与实践”(编号: JG18022)

作者简介: 张琴(1979-), 女, 馆员, 博士, 主要从事文检课教学与学科服务。E-mail: sunshine@scau.edu.cn

本馆只购买 CNKI 和维普数据库,万方数据库没有购买,但读者使用频次还是较高。这可能与图书馆的宣传有关,万方数据库虽然没有购买,但是由于使用价值较高,读者可以先免费检索摘要,如果确实需要原文,而图书馆没有购买,可以通过原文传递途径获取。读秀在研究生群体的使用频次较高(47.83%),远远高于教师群体(6.06%)。读秀具有便捷的自动原文传递功能和丰富的中文图书资源,这些应该对科研人员都需要,特别是教师群体。问卷调查用户使用文献类型的数据显示教师使用图书这一文献类型的比例是高于研究生的,但为何读秀的使用频率反而相对要少,其中的缘由值得思考,可能与图书馆在开展读者培训、研究生教学中的宣传对象差异有关,教学培训的主要对象是研究生。

(3)科研人员使用图书馆外文文摘数据库的情况如下:排在最前列的是SCI,其次是medline。SCI使用频率最高的原因与图书馆的经费投入、学校乃至国家的政策导向应该不无关系。medline的高使用频次与预防兽医学专业的特点有关,这也是medline数据库的预约培训如此火热的原因。

(4)科研人员最经常使用的外文全文型数据库最多的分别是:Elsevier 期刊全文库、Science Online、Springer 期刊、图书全文库、Nature Publishing Group。

(5)除图书馆购买的数据库之外,科研人员经常访问或使用的数据库或网站主要有:google、googlescholar、NCBI、pubmed、WHO(世界卫生组织)、OIE(动物世界卫生组织)、美国微生物学会ASM数据库、广东省科技图书馆等。

3 利用博士论文引文分析常用期刊及其来源

博士论文的写作过程吸收信息的时间跨度大,学术性和专指性强,对文献的需求量比一般科技论文多10倍以上^[9]。预防兽医学作为华南农业大学国家重点学科之一,近年来为我国动物疫病(包括禽流感、SARS等)的防控做出了重要贡献,对该专业的博士学位论文进行引文分析具有一定的代表性。通过引文分析,可以比较集中地反映出预防兽医学研究人员使用文献信息的一般规律和特点,有利于兽医学科馆员有针对性地开展学

科服务工作。本文选择该校预防兽医学专业2007~2016年的81篇博士论文作为引文分析的来源。

3.1 引文分析方案设计

采用全部抽样方式。经检索华南农业大学图书馆馆藏资源和华南农业大学学位论文服务系统(<http://202.116.174.2:8089/>),2007~2016年预防兽医学专业博士论文共81篇,将这些论文的参考文献导入Excel中,对其开展引文类型、数量、年代分布等分析,并对主要引文来源—期刊的语种和集中度进行分析。

3.2 引文分析结论

3.2.1 引文数量

81篇博士学位论文共有有效参考文献13532篇,论文平均引文数量为172篇,最多355篇,最少53篇。基本情况见表1。

表1 2007~2016年度预防兽医学专业博士论文引文数量分布

毕业年份	论文篇数	引文数	平均引文数	最高引文数	最低引文数
2007	3	646	215.3	279	149
2008	9	1341	149	220	97
2009	6	916	152.7	210	107
2010	9	1650	183.3	267	101
2011	9	1354	150.4	234	109
2012	9	1477	164.1	283	118
2013	13	2149	165.3	355	53
2014	6	904	150.7	180	87
2015	11	2142	194.7	312	121
2016	7	1155	165	257	124

3.2.2 引文的文献类型

引文来源以期刊为主,占96.6%,这与问卷调查结果一致。引文的类型分布见图1(图见第52页)。值得注意的是:90%~95%的研发成果会首先出现在专利文献中,80%的技术仅存于专利文献中,专利文献对预防兽医专业领域技术研发与创新具有重要参考作用。问卷调查结果也显示专利文献是科研人员经常使用的一类文献,但引文分析结果显示,科研人员使用专利文献极少,十年间的专利文献引用数据量仅有2条,其中的原因值得思考。

3.2.3 期刊引文年代分析

预防兽医学专业博士论文引文年度跨度大,最早的一条是1887年的,最晚为2017年,期间跨越近百年。文献年代相对集中在近10年,所占比例为52.7%,95.2%以上的文献分布于自1987年以来的近30年间。其中,外文期刊出版30年后的累计被引用率为93.3%,出版10年后的累计被引用率为33%,被引高峰期出现在期刊出版5~10年后。

3.2.4 引用期刊刊名分布表

在81篇预防兽医学博士论文引文中,1252条中文期刊引文包含399种刊,11710条外文期刊引文涉及2192种刊。通常来讲,期刊的离散性水平为20%的期刊满足80%的需求。表2列出了覆盖期刊引文20%、40%、60%、80%和100%的期刊种数,占外文期刊18%的381种期刊覆盖了80%的英文引文;占中文期刊38%的104种期刊覆盖了80%的中文引文。

表2 引用期刊刊名分布表

文献	20%	40%	60%	80%	100%
外文期刊	5 (0.24%)	22 (1.04%)	89 (4.23%)	381 (18%)	2106 (100%)
中文期刊	5 (1.25%)	15 (3.76%)	46 (11.53%)	153 (38.35%)	399 (100%)

3.2.5 引用次数排名前10的期刊分析

引文引用的期刊总量为2591种,期刊被引用次数共12962次,占95.79%(总引文量13532条),

是最重要的引文来源。本文对期刊这种引文来源进行分析发现:

(1)期刊的集中度比较高。被引用次数位列前十名的期刊,被引用次数合计3325条,占28.48%,即占全部期刊比例不到1%的期刊,引用次数超过了期刊文献总引次数四分之一。被引用次数位列前五名的期刊,被引用次数为6161次,即占全部期刊并列不到2%的期刊,被引用次数占约近五成。

引用次数最多的3种期刊,占引文次数约七分之一。引文次数最多的期刊为《Journal of Virology》,被引用1334次,所占比例超过期刊引文条数的十分之一。其次是《Virology》,被引用514次,占3.97%,第三名为《Nature》,被引用257次,占1.98%。三者合计2105次,占16.24%。

(2)引文语种以英文为主。在被引用次数最多的前10种刊中,全部是英文期刊,没有中文期刊。前30名中,中文期刊2种。其中,中文期刊被引文次数最多的是《中国预防兽医学报》,共被引用76次,列第22名。其次是《中国兽医学报》,被引用65次,列第26名。引用次数前10名的期刊列表见表3。

4 预防兽医学科服务实践

预防兽医学科研人员的专业知识、教育背景、研究方向等都会影响其信息行为和信息需求。通过上文的访谈法和引文分析法,大致可以知道,中国预防兽医学者在科研工作中使用的主要文献资

表3 引用频次Top10的期刊

排名	刊名	被引频次	所占比例 (%)	SCI收录情况	影响因子 (2017年)	中科院分区 (2018年)	数据库	保障情况
1	Journal of Virology	1334	10.29%	是	4.368	医学2区	ASM 文摘库	否
2	Virology	514	3.97%	是	3.374	医学3区	Elsevier 期刊全文库	是
3	Nature	257	1.98%	是	41.577	综合性期刊1区	Nature Publishing Group	是
4	Journal of General Virology	256	1.98%	是	2.514	医学3区	the Microbiology Society	是
5	Vaccine	228	1.76%	是	3.285	医学3区	Elsevier 期刊全文库	是
6	Proceedings of the National Academy of Sciences	224	1.73%	是	9.504	综合性期刊2区	PNAS(美国国家科学院汇刊)	是
7	Science	187	1.44%	是	41.058	综合性期刊1区	Science Online	是
8	Veterinary Microbiology	185	1.43%	是	2.525	农林2区	Elsevier 期刊全文库	是
9	Avian Diseases	144	1.11%	是	1.328	农林科学3区	BioOne 生物学期刊数据库	是
10	Archives of Virology	111	1.02%	是	2.16	医学4区	Springer 电子期刊、电子图书全文库	是

源类型是期刊,其他文献类型特别是专利文献,使用很少。期刊来源多为历年来SCI来源刊,且多为医学、农林科学与综合性类期刊。根据以上结论,图书馆开展了以下针对预防兽医学学科服务实践:

4.1 设计嵌入式教学的内容

嵌入式教学是近两年在该校兽医学院创新性地开展的一种学科服务。通过问卷调查和引文分析发现,教研人员对专利文献的使用还不是很充分。因此,针对预防兽医学研究生开展嵌入式教学中,在与专业任课教师进行充分讨论之后,在原有课程基础上增加“专利基础知识—专利信息资源—专利信息检索—专利分析实务”的教学内容,由专门从事专利信息服务的学科馆员负责授课,并在图书馆主页中专门设置了专利信息服务专区,提供各种专利文献检索及专利咨询服务。

通过引文分析发现,教研人员最常用的文献类型是期刊,尤其是外文期刊。这是因为期刊出版周期短,发行速度快,所刊载的信息时效性强、内容新颖丰富,能及时反映学科专业发展的新方向、新成果等前沿信息。但是由于历年数据库价格的不断上涨,图书馆经费紧张,对于一些与预防兽医专业相关全文数据库如wiley数据库经常被停订。科研人员要获取期刊全文,原文传递是一种有效的途径。因此,在设计嵌入课程是又增加了原文传递及原文查找方法的内容。

与专业课老师共同确定的嵌入式教学内容主要包括:中外文数据库的使用、专利文献检索与分析及原文查找等。该课程在研究生评教系统中反映良好,评教分数位于同类课程的前列。专业任课老师也与学科馆员形成了良好的互信合作关系。

4.2 确定专题培训和预约培训的相关内容

部分科研人员的信息获取技能不够健全,还需要多方面的信息培训。问卷调查结果显示:SCI、medline、国际三大农业数据库是科研人员常用的数据库。学科馆员在与教师/研究生交流中发现,这些数据库中检索技术的有效利用和数据库功能的充分挖掘还存在着不少的问题。另外,该专业博士研究生要顺利毕业,发表高质量的SCI论文是一个最基本的指标,SCI数据库不仅可以检索文献、检索文章的被引情况,更是具有功能强大的分析

功能,对科研人员准确把握研究领域的热点和趋势、快速寻找合适的SCI来源刊进行投稿具有一定的作用。针对以上情况,学科馆员在每学期开展相应的专题培训和预约培训。

4.3 加强兼职学科馆员服务小组管理

大量而繁重的学科服务工作与有限的学科馆员队伍之间的矛盾一直困扰着各高校图书馆学科服务的有效开展。华南农业大学图书馆利用研究生兼职学科馆员参与学科服务虽取得了一定的效果^[10],但问题依然较多,主要包括因研究生学习科研任务繁重,服务时间和持久性难以保障,研究生自身的信息素养水平也参差不齐,学科服务的质量也难以保障。为此,学科馆员进一步加大了对预防兽医研究生兼职学科馆员的培训力度,采取每周通过QQ群进行服务进展汇报与问题讨论解答,每双周进行一次集中业务培训;与该学院领导沟通,联合兽医学院研究生学生会,与图书馆信息部共同管理研究生兼职学科馆员,此举进一步增强了研究生兼职学科馆员的工作热情,提高了嵌入式教学与培训的效率,也有效保障了研究生能持续参与学科服务活动。

4.4 完善学科资源建设

问卷调查显示,科研人员经常使用美国微生物学会ASM数据库,引文分析也发现,《Journal of Virology》作为该专业科研人员使用频率最高的期刊,就被收录在ASM数据库中。因此,ASM数据库是图书馆需要重点保障的数据库资源,但该校图书馆由于经费紧张的原因并没有购买。为此,学科馆员与数据库商联系,申请开通ASM数据库多次试用,并与该学科的系主任进行沟通,希望通过馆院共筹等多种途径购买,进一步完善预防兽医学学科资源。目前该项目正在进行中。

参考文献

- [1] 曾晓牧,林佳.基于学科有效信息行为的学科服务实践——以清华大学数学学科为例[J].大学图书馆学报,2014,32(03):85-90.
- [2] 张计龙,殷沈琴,陈铁.基于ERU的图书馆用户信息行为数据采集方法研究——以复旦大学图书馆为例[J].图书馆杂志,2014,33(12):10-16.
- [3] 于静,刘迎春,李书宁,等.基于学科特点与用户信息行为分析的学科服务探索与实践——以北京师范大学图书馆3.0版

浅谈藏区特色农产品质量提升与流通平台建设

吴文栋, 林伟君, 刘楷, 陈燕苹, 凌焕枝, 梁远航, 周广洲*

(广东省农业科学院农业经济与农村发展研究所, 农业农村部华南都市农业重点实验室,
广东广州 510640)

摘要: 西藏地区地域广阔, 拥有丰富的高原特色农产品资源。本文通过分析藏区农产品质量与流通现状及存在问题, 提出建立藏区特色农产品质量提升与流通平台的方法与原理, 为改善农产品的生产环境和质量安全, 促进藏区农民的收入与提高生活水平, 推动农业发展新进程起到重要作用。

关键词: 藏区; 特色农产品; 质量; 流通; 平台建设

中图分类号: S87 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2019)04-0022-03

Discussion on quality improvement and circulation platform construction of characteristic agricultural produces in Tibet

WU Wendong, LIN Weijun, LIU Kai, CHEN Yanping, LING Huanzhi,
LIANG Yuanhang, ZHOU Guangzhou*

(Institute of Agricultural Economics and Rural Development, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Urban Agriculture in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Tibet has a vast territory and abundant agricultural products resources with plateau characteristics. Based on the analysis of the current situation and problems of agricultural product quality and circulation in Tibet, this paper puts forward the methods and principles of establishing a platform for improving the quality and circulation of agricultural products with Tibetan characteristics, which plays an important role in improving the production environment and quality safety of agricultural products, promoting the income and living standards of farmers in Tibet and promoting the new process of agricultural development.

Keywords: Tibetan area; Special Agricultural Products; quality; circulation; Platform construction

进入21世纪以来,我国进入高速信息发展时代,互联网技术已经应用到社会的各个领域,为人们提供了便捷、安全和高效的服务。互联网和计算机的普及,促使国内电子商务得以快速发展,已逐渐使人们从传统的购物转向网上购物。随着我国经济的发展,

人民生活水平的提高,消费者有着追求健康生活+互联网购物需求,消费者买的不仅仅是产品,更是健康的生活,因此农产品需要让消费者从产品种植基地、物流体验、可追溯、供应链可视化等维度全程展现。近年来,随着互联网在乡村的普及和物流体系的逐

收稿日期:2019-04-23

基金项目:广东省科技计划项目(2017A020224018)

作者简介:吴文栋(1985-),男,广东广州人,本科,高级工程师,主要从事农业信息化研究。E-mail: 393776117@qq.com

*通讯作者:周广洲(1982-),男,湖北咸宁人,本科,主要从事农业信息化研究。E-mail: 494882856@qq.com

步完善,农产品电子商务得到快速发展,交易量也持续保持增长,促进了乡村的商贸流通、带动了创业创新、增加了农民的收入。

西藏地区地域广阔,拥有丰富的高原物产、珍贵药材等,具有其他地区无法比拟的高原特色优势。然而西藏地区农业生产管理还比较落后,农产品质量有待提升。另外,西藏地广人稀,交通不便,大量农特产品无法外销,农产品流通也是亟待解决的问题。因此,本文针对以上问题而提出建立藏区特色农产品质量提升与流通平台,以数字网络为基础,以农产品资源为内容,以互联网技术为支撑,以互联网流通渠道为手段,提升农产品质量。同时,通过电子商务扩展藏区特色农产品市场,降低经营成本,促进特色农业产业化发展。

1 藏区农产品质量与流通现状及存在问题

1.1 农产品质量安全意识偏低

西藏地区绝大部分农民受教育程度偏低,特别是贫困地区的农民,文化知识水平较低、专业技能较弱、对农产品质量安全认识仍普遍偏低,对其危害性、严重性和责任意识认识不足,他们受传统生产观念的影响,未形成质量安全意识,容易滋生质量安全隐患;另外,一些企业经营者对农产品质量安全重视不够,自律意识不强,受利益驱动,片面追求产量而忽略质量,不按标准生产,违法违规使用农兽药等现象依然存在^[1]。

1.2 农产品流通渠道不规范

目前,西藏地区的农产品绝大多数在生产地以原始产品的形式销售。一小部分通过淘宝、京东和苏宁易购等综合类电子商务平台销售,这些平台聚集的西藏特色农产品数量较多,但各商品鱼龙混杂,价格差别也较大。另外,还有一些如“藏善堂”、“藏贡”、“西藏土特产商城”等知名度较低的在线商城,都难以进入消费者视野。近年来,随着微商的兴起,还有一些商家利用微信商城、朋友圈、QQ群等方式进行藏区特色农产品销售,但这种形式往往缺乏监督保障,以熟人间的相互信任为交易担保,一旦产生纠纷,交易双方很难得到保障^[2]。

1.3 农产品物流成本高

西藏地区偏远,交通网络不够发达,物流基础

薄弱,运输成本高。农产品流通过程中存在包装难、运输难、仓储难等问题。目前,西藏地区农产品物流多以常温物流形式为主,缺乏冷冻冷藏设备和技术,导致农产品在采摘、运输、储存等物流环节的损失率达30%,其中存在大量不合理运输及不合理包装问题,致使农产品物流成本过高^[3]。

2 平台建设思路

针对藏区农产品在质量提升与市场流通过程中存在的问题,利用网络信息技术和现代营销方式,建立一个产品能溯源、质量有保证、销售配送有保障的全产业链体系,进一步提高藏区特色农产品的质量及市场流通效率,建成“三平台,一体系”,集科学性、实用性和示范性于一体的藏区特色农产品质量提升与流通平台。

(1)运用大数据、云计算、物联网等信息技术与传统农业生产管理相结合,建立智能化、标准化的农产品质量提升平台,通过“技术服务+全景溯源+诚信体系”的模式,提高贫困地区农业生产管理的科技含量,助力农产品质量的提升。

(2)充分发挥藏区优越的生态环境及特色的品种优势,建立藏区特色农产品流通平台及微商平台,形成集特色农产品线上展销及线下体验于一体的电商运营体系。

(3)通过与第三方支付平台与物流公司合作,基于特色农产品流通平台及微商平台,开通网上电子支付功能,完善物流配送服务,健全平台购销服务评价和反馈机制。

3 平台总体设计

3.1 建立藏区农产品质量提升监控溯源平台

农产品质量安全问题,是当前政府重视、社会关注的热点,不仅关系到公众的身体健康,而且对农业发展、农民增收、贸易流通和农业现代化建设具有重大影响^[4]。通过农产品质量追溯技术,对农产品生产管理过程进行“数字化管理”,是有效提升农产品质量,实现对农产品“从田头到市场到餐桌”的全程质量监控。

根据藏区农户科学种养技术水平低,组织化程度低等实际情况,运用大数据、云计算、物联网等信息技术与传统农业生产管理相结合,搭建基

于农业物联网云平台与智慧农业全景溯源平台为核心的农产品质量提升监控溯源平台,通过在藏区的主要农业生产区域内部署各类农用传感器、农用控制器、摄像头等终端设备,利用云计算技术,平台统一采用软件即服务模式(SaaS)运营,将采集到的环境参数、设备运行状态、实时视频等,通过智能网关直接将数据集中到公有云数据中心统一处理,为平台提供后台数据服务。同时,采用“移动互联网”技术,通过开发不同终端的服务软件,根据不同人群和不同的使用场景,提供个人电脑、平板电脑、智能手机、智能电视“四屏合一”的使用体验。

另外,基于ESB架构建立的智慧农业全景溯源平台,通过各类农用传感器、农用控制器、摄像头等终端设备在生产过程中采集环境和农作物相关数据,接入智慧农业物联网云平台,基于大规模历史数据的数据挖掘和智能分析帮助管理者提供更好的决策建议。同时,利用二维码、RFID等身份识别技术,将农业生产环节,加工环节与流通环节的信息进行采集并集合,通过“技术服务+全景溯源+诚信体系”的农业科技服务与产品流通模式构建,对农产品质量安全实现信息化管理,使农产品质量进一步得到提升。让消费者做到“明白购买,放心消费”,确保消费权益得到维护。

3.2 建立藏区特色农产品流通平台

在目前市场经济下,对于农产品的生产经营,没有好的流通模式,将阻碍农产品的流通,从而直接影响农业产业化进程和农民利益。目前,消费结构发生巨大变化,网络购物越来越普及,农产品电子商务正在逐步改变人们对生鲜农产品的消费方式和购买行为,人们生活方式和节奏的变化以及消费者对生鲜农产品的安全、高品质、多样化产生极大需求。

充分发挥藏区优越的生态环境及高原物产优势,基于农产品质量提升平台,建立集农产品仓储、物流、电子商务于一体的藏区特色农产品流通平台及基于XML web service综合管理后台,管理员可以通过后台轻松发布农产品信息、农业百科、展示推广等信息,并定期开展团购、预售等活动,在平台上流通的农产品全部实现全程的可追溯制度,让消费者买得放心,吃得安心。同时,平台实

现O2O(即Online to Offline)模式,让线上的电子商务平台与线下的实体店相结合,让消费者既可以享受线上电商购物的便捷,又可以进行线下实体产品的体验,形成集特色农产品线上展销及线下体验于一体的电商运营体系。

3.3 建立藏区特色农产品微商平台

在逐渐成熟的移动互联网时代,人们的交流方式不断发生着变化,2018年,微信每个月有10.82亿用户保持活跃,微信影响力正在迅速提升,深刻改变着人们的生活,成为了目前最受大众欢迎的移动互联网交流平台之一。微商是基于微信的一种商业运用,基于微信的传播速度及其简便等优点,为大众提供一个便捷的平台进行更为现代的电子商务。

基于微信手机软件,建立藏区特色农产品微商平台,平台以智能手机等移动设备为载体,利用微信公众平台庞大的用户量,通过现代信息技术,开发基于web的微商平台,建立一个推广传播速度快、范围广、方便快捷的特色农产品专卖微店,微商平台同时与农产品质量提升平台及流通平台接合,实现互联互通,为消费者提供健康优质的农产品,让消费者获得方便快捷的购物体验。

3.4 建立电子支付与物流配送服务体系

电子支付为商家和银行之间建立起连接,可以安全实现从消费者、金融机构到商家的在线货币支持、现金流转、资金清算、查询统计等流程。物流配送是一种现代的流通方式,物流配送定位为电子商务的客户提供服务,物流配送效率的高低是电子商务成功与否的关键,物流配送是电子商务的基础和前提条件。因此,电子支付保障了电子商务资金流转的有效实施,而物流则是交易执行的保证。

基于特色农产品流通平台及微商平台,通过与微信或支付宝等第三方支付平台合作,使用目前最为便捷的电子支付手段进行的支付,具有方便、快捷、高效、经济的优势。另外,引入第三方物流公司,完善物流配送服务。对于交通不发达的偏远地区,第三方物流公司拥有相关领域的专业资源和经验优势,具有完善的仓储、运输、配送服务,可以较低的成本,保质保量的完成物流任务。

猪场免疫防控工作要点

容庭¹, 刘志昌¹, 张洁², 王刚¹, 李书宏¹, 彭广辉¹, 马现永^{1*}

(1. 广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室,

广东省动物育种与营养公共实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室,

广东畜禽肉品质量安全控制与评定工程技术研究中心, 广东广州 510640;

2. 清远市龙发种猪有限公司, 广东省种猪育种工程技术研究中心, 广东 清远, 513058)

摘要: 鉴于当前猪场疫病防控的突出问题, 为了更好地服务猪场做好免疫防控工作, 真正了解掌握免疫防控技术相关知识, 正确选择与使用疫苗, 笔者结合猪场实际应用, 从免疫工作要求、接种要点、疫苗使用等方面进行综述。

关键词: 猪场; 疫苗; 免疫要点; 卫生制度

中图分类号: S851.33 **文献标识码:** C **文章编号:** 1005-8567(2019)04-0025-04

目前, 我国畜牧业转型升级及快速发展, 导致生猪疾病的发生与发展趋于复杂化, 耐药性细菌种类递增、抗生素的剂量随之加大^[1-4], 产生了一系列负面影响, 因而抗生素全面禁止的步伐临近。鉴于此, 微生物制剂、酸化剂、酶制剂和植物提取物等添加剂^[4, 5], 被认为是最有潜力替代抗生素的物质, 虽然在生产上大量推广应用, 但真正能替代抗生素的有效方案缺乏。此外, 疫苗研发滞后, 旧病未除, 新病来袭, 疫病防控难上加难。因此, 有效免疫是当前疾病防控最有效的手段。

1 免疫工作要求

1.1 基本要求

1.1.1 疫苗贮藏和运输

(1) 各种类型的灭活疫苗(油苗)应在 2~8℃下避光冷藏(冰箱冷藏格), 夏季应采用冷藏运输, 注意防止冻结或长时间暴露。

(2) 弱毒疫苗一般在-15℃以下保存(冰箱结冰格), 应采用冷藏运输。

1.1.2 疫苗使用要求

接种的动物必须临床表现健康, 注意天气变

化、高(低)温、转栏、饲料更换等应激因素对免疫效果的影响。不同类型疫苗使用要求不同:

1.1.2.1 弱毒疫苗

(1) 接种过程要求一定要避免阳光直接照射, 注意保持低温。稀释后须在说明书规定的时间内完成使用。

(2) 弱毒疫苗对细菌类等部分抗菌药物敏感, 在免疫的前后 1 周内, 免疫过的动物应避免使用抗菌药物。

(3) 做好注射针头的更换, 防止交叉污染。针头选用 7-9 号为宜, 猪场最好做到一畜一针头, 特别是紧急免疫或场内动物有隐性感染疾病的情况时, 至关重要; 或同一养殖场的家畜, 每注射完一栏的家畜, 至少要更换针头一次。

1.1.2.2 灭活疫苗

(1) 使用前要仔细核对疫苗的抗原亚型, 详细记录生产批号和有效期, 如包装破损、破乳分层、颜色改变等现象的疫苗不得使用。

(2) 使用前应置于室温(22℃左右) 2 小时左右, 使用时应充分摇匀, 使用过程中应保持匀质。疫苗启封后, 应于 24 小时内用完。

收稿日期: 2019-03-12

项目来源: “龙发”种猪及高效健康养殖技术的示范推广(2017A004); 规模化猪场疫病智能防控系统研究与示范推广(JHXM2017003)

作者简介: 容庭(1983-), 男, 海南乐东人, 硕士, 高级畜牧师, 从事生态养殖与环境控制研究。E-mail: blueskyrt@163.com

*通讯作者: 马现永(1971-), 女, 博士, 研究员, 研究室主任, 从事肉品质安全、生态养殖与环境互动研究。E-mail: 407986619@qq.com

(3)注射针头以12号为宜,避免交叉污染的注意事项同上述弱毒疫苗的做法。

1.1.3 做好免疫档案工作

生产场、养殖户或免疫注射操作人员需严格按免疫记录本、档案的使用要求,健全免疫记录、免疫档案,每个群体(如购入的同一批次的肉猪、肉鸡苗、同一批次出生的仔猪等),应采用专页记录。

1.1.3.1 购入信息记录

(1)记录动物品种及用途,如种母猪、肉猪等。

(2)记录动物来源,如购进详细信息,养殖方式、繁育性能等。

(3)记录购入日期、日龄、数量、购入前的免疫情况、正常出栏日龄等。

1.1.3.2 疫苗使用记录

(1)疫苗使用信息记录要完整。包括:疫苗出厂的详细信息、厂家或代理商的资质信息、接种时间、剂量、操作人签名、动物健康状况备注等信息记录。

(2)疫苗免疫后出现副作用等信息记录要清晰。包括:副作用程度、动物反常行为特点、添加营养元素和药物使用情况,以便总结成功的经验或查找原因。

2 免疫接种要点

免疫接种是养殖场畜禽传染病防控的重要措施之一,是通过有组织、有计划地对群体进行接种疫苗或生物制品,使群体产生特异性抵抗力,免受发生感染疫病的有效手段。做好猪场免疫接种工作,落实以下几个方面工作。

2.1 适宜本场免疫程序的建立

有效的免疫程序是通过长期不断去实践和摸索总结出来的。因地制宜地建立本场的免疫程序,主要有以下几方面的内容:

(1)要考虑本地区及周边区域疫病流行及严重程度情况,疫病流行特点。

(2)要考虑母猪母源抗体、仔猪抗体状况,仔猪、生长肥育猪的发病日龄,发病批次,发病季节,免疫时间间隔等因素以及以往免疫效果,依此确定疫苗的种类和免疫适宜时机。

(3)要考虑本地区、本场及周边场区尚未证实发生的新流行疾病,须经证实受到严重威胁时才

进行免疫接种,慎重选择疫苗类型。

2.2 优质疫苗的选择

疫苗质量的好坏,直接关系到免疫接种的效果,因此,在选择疫苗时,做好三项检查:

(1)检查生产厂家或代理商的认证资质(GMP或GSP)是否有效和完整,疫苗的生产批文、检验报告书及说明书是否符合国家标准。通过正规单位,正规途径购入,远离非法经营单位或个人,以免买进伪劣疫苗,保证购入安全有效。

(2)检查疫苗出厂详细信息,包括二维码或条形码,外包装外部标签完整,包括产品名称、注册商标、规格、用途、用法与用量、主要成分、批准文号、保存条件、生产日期、有效期、企业名称等,每箱内有产品合格证。

(3)检查疫苗质量,通过肉眼和实验判断决定其质量。发现疫苗瓶有裂纹、瓶塞密封不严、受过冻结、失真等外观问题,液体或粉末变色、污染、发霉、有摇不散凝块或异物等疫苗不得使用。

2.3 疫苗运输和保存的要求

猪用疫(菌)苗是生物制品,有液体和固体制品。不同类型的生物制品,运输和保存条件不同。

(1)冻干疫苗

①长途运输:采用低温冷藏车,维持温度不能超过0℃;短途运输:采用冷藏箱加冰块的方式,保持较低的温度,避免高温和阳光照射。

②保存条件:长时间保存时应置于-15℃以下的冰箱中冻存。短时间保存备用时应于0~8℃冷藏保存,最好不超过6个月。

(2)油佐剂灭活疫苗

①长途运输:采用低温冷藏车运输,温度维持在2~8℃之间,温度太高或太低会缩短有效期,也不能冻结,冰冻会造成疫苗破乳分层而失效。

②保存条件:长时间保存应置于2~8℃的冰箱或冷库内冷藏,所有疫苗和菌苗均应在干燥条件下保存,短时内使用的可置于阴凉处。

对存有疫苗的冰箱、冰柜或冷库应每天检查一次其运行情况,以防出现故障导致疫苗失效。发生停电24小时以上时要及时采取措施,保证温度不会过高。

2.4 接种生猪的常规检查

按计划给猪群接种疫苗前,应查阅猪群档案,

并咨询饲养员了解猪群近期的健康状况,例行猪群的日常检查。发现精神、食欲、体温不正常的、有病的、体质瘦弱的、幼小的、年老体弱的、怀孕后期等免疫接种禁忌的对象,不予接种或暂缓接种。

2.5 无菌操作的执行落实

(1)接种器具的操作:注射器、针头、稀释疫苗瓶等器具应彻底洗净,采用高压灭菌锅灭菌或开水煮沸10~15分钟。

(2)接种人员的穿戴:工作服、鞋、帽等消毒,操作人员配带一次性口罩,指甲应剪短,用消毒液洗手或戴一次性乳胶手套。

(3)疫苗瓶盖的消毒:用75%酒精擦拭瓶盖,再用注射器抽取疫苗,应避免针头交叉污染,禁用注射过疫苗的针头去吸取疫苗。

(4)注射部位的消毒:注射部位应先消毒(推荐使用碘伏、高效碘消毒液、聚维酮碘,1%浓度),再进行注射。

2.6 疫苗的正确使用

(1)要详细阅读使用说明书,了解其用途、用法、用量及注意事项等。

(2)慎重选择疫苗稀释液,筛选稀释方法,严格按照说明书规定稀释,以免影响免疫效果。疫苗现配现用,使用过程中要随时振摇均匀,并且在规定的时间内用完。弱毒疫苗3~6小时内用完,灭活苗当天用完。口服疫苗最好在喂食前服,以便每头猪均能吃到,禁用热食、酒糟、泔水发酵饲料拌苗。

(3)免疫接种方式和接种部位的选择:接种方式有肌肉注射、皮下注射、口服等,注射部位选择内股、臀部或耳根后均可。

(4)接种用的注射器、针头等器具,用完应立即清洗、消毒处理,疫苗瓶及其剩余液体要高温无害化处理,严防散毒。

2.7 接种后反应的观察与处理

(1)猪群免疫接种后,应加强饲养管理,减少应激。可在饮水中加入抗应激产品,如水溶性多维、维生素C等,能有效缓解和降低各种应激反应,增强免疫效果。

(2)认真观察猪群免疫接种后1周内的健康状况,并做好记录。如发轻微的生副作用或反应,出现体温升高、发抖、呕吐和减食等症状,一般1~2

天后可自行恢复;发生反应严重或过敏反应的,可注射肾上腺素抢救或地塞米松肌肉注射。

2.8 接种前后慎用药物

(1)猪只免疫前后1周,禁用肾上腺皮质酮类等抑制免疫应答的药物;对于弱毒菌苗,在免疫前后1周禁用抗菌药物;口服疫苗前后2小时禁止饲喂酒糟、抗生素渣及发酵饲料,以免影响免疫效果。

(2)免疫接种前后3~5天,期间应补充水溶性多维、电解质、维生素C,防止应激反应。灭活疫苗或病毒病的弱毒疫苗注射使用,可考虑在饮水中添加预防性的抗菌药物。

2.9 人员防护及避免交叉污染

(1)防疫人员进行免疫接种时,要注意做好人员防护,要求穿工作服或防护服(或防护服)、雨鞋、戴口罩、一次性帽子、手套。

(2)进出场区时须严格消毒,更换场区免疫时应要更换鞋帽,严格消毒,以避免交叉污染,防止人为传播疫病。

(3)恶劣天气时要避免户外免疫操作。

3 健全防疫卫生制度

3.1 严格落实防疫制度

(1)落实农业部重大动物疫病免疫方案。结合本场实际制定并执行疫病免疫程序,建立免疫档案。

(2)建立主要疫病监测制度。结合本场实际制定并执行监测制度,监测结果应达到农业部规定的相关标准。

(3)建立重大动物疫病控制与扑灭制度。发现疫病应及时采取处理措施,上报上级主管单位。

(4)健全引种管理制度。原则上生产场应实行自繁自养,不得从疫区引进种用畜禽,引种时按规定向当地动物防疫监督机构报检。

3.2 认真落实卫生制度

(1)落实消毒防疫制度。根据流行病学的特点,定期开展环境消毒、场舍消毒、设施设备消毒及带畜消毒。

(2)落实卫生清洁制度。定期开展灭鼠、灭蚊、灭蝇、灭蟑螂等活动,或请专业公司定期开展此项活动。

(3) 健全日常工作制度。工作人员场内生活、出入生产场区工作制度、外来人员、车辆进场防疫消毒管理制度。

(4) 规范场区检疫工作。积极配合动物防疫监督机构开展产地检疫工作, 按规定报检。

4 结语

猪免疫抗体和感染抗体的高低与疫病的发生密切相关, 做好猪场免疫工作尤为重要。只有科学免疫, 提高免疫抗体的水平; 加强卫生消毒, 杀灭病原菌, 减少猪体与病毒和细菌接触的机会; 提高科学饲养管理水平, 增强猪体抵抗力, 才能有效抵制病毒入侵, 减少疫病或继发性疾病的发生。近期, 非洲猪瘟的大面积爆发, 映射了疫苗研发的

步伐滞后。因此, 加快新型疫苗的研发投入, 做到防患于未然。

参考文献

- [1] 巩霞, 程学慧. 饲用抗生素抗药性研究: 现在与未来[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(22):26-33.
 - [2] 刘梦元, 吴斌, 刘建杰, 等. 规模化猪场大肠杆菌的耐药性监测及血清流行病学调查[J]. 中国兽医学报, 2004, 24:16-18.
 - [3] 王红宁, 刘书亮. 规模化猪场致病性大肠杆菌、沙门氏菌药敏区系调查[J]. 西南农业大学学报, 2000, 13:84-90.
 - [4] 王红玉, 陈杰, 宋益贞, 等. 家禽生产中抗生素替代品研究进展[J]. 中国家禽, 2018, 40(3):39-42.
 - [5] 金立文. 植物提取物添加剂在动物营养中的应用及其机制的研究进展[J]. 动物营养学报, 2010, 22(5).
-
- 上接第13页
- [25] GIAMMARIOLI M, PELLEGRINI C, CASCIARI C, et al. Development of a novel hot - start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus[J]. Vet Res Commun, 2008, 32:255-262.
 - [26] 曾少灵, 花群义, 杨俊兴, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(9):1173-1178.
 - [27] 董志珍, 侯艳梅, 赵祥平, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(9):3-6.
 - [28] 郭少平, 刘建, 吴绍强. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量 PCR 检测技术的研究与评价[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(4):76-80.
 - [29] MCKILLEN J, MCMENAMY M, HJERTNER B, et al. Sensitive detection of African swine fever virus using real-time PCR with a 5' conjugated minor groove binder probe [J]. Virol Methods, 2010, 168:141-146.
 - [30] 陈静静, 罗宝正, 沙才华. 多重荧光 PCR 鉴别诊断猪瘟病毒和非洲猪瘟病毒[J]. 湖北畜牧兽医, 2012, 9(2):4-6.
 - [31] 王建华, 赵祥平, 董志珍, 等. 一种鉴别非洲猪瘟病毒和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒二重荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(1):19-25.
 - [32] 王建昌, 王金凤, 刘立兵, 等. 非洲猪瘟病毒 RPA 等温检测方法的建立[J]. 中国动物检, 2016, 33(7):78-81.
 - [33] 李林, 刘拂晓, 樊晓旭, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光 RPA 快速检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(8):87-91
 - [34] RONISH B, HAKHVERDYAN M, STAHL K, et al. Design and verification of a highly reliable Linear - After - The - Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus[J]. Virol Methods, 2011, 172:8-15.
 - [35] 王彩霞, 刘建, 林祥梅, 等. 环介导恒温扩增技术快速检测非洲猪瘟病毒[J]. 动物医学进展, 2010, 31(2):15-19.
 - [36] 杨吉飞, 关贵全, 刘志杰, 等. 非洲猪瘟病毒环介导恒温扩增快速检测技术的建立及应用[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 19(4):7-12.
 - [37] 张鑫宇, 左伟勇, 朱善元, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗体胶体金试纸条检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(4):281-285.

基层建设病死畜禽无害化处理体系 工作中的问题及对策

岑兴洪

(肇庆市畜牧兽医局, 广东 肇庆 526040)

摘要: 本文对县镇基层建设目前病死畜禽无害化处理体系工作中存在的问题作初步分析, 并从推进建设病死畜禽无害化处理场所、建立病死畜禽收集处理运行机制、加大政府经费投入完善配套保障政策、做好舆论宣传教育和依法严厉打击违法犯罪行为等方面强化病死畜禽无害化处理体系建设, 构建病死畜禽无害化处理长效机制。

关键词: 畜禽; 无害化处理; 对策

中图分类号: S851 **文献标识码:** C **文章编码:** 1005-8567(2019)04-0029-03

根据国家农业农村主管部门的统计数据, 目前我国畜禽养殖规模化率达到58%左右, 中小规模养殖场依然是真正的主力军^[1]。而这部分中小规模畜禽养殖场户畜禽饲养数量多, 规模化养殖程度不高, 动物防疫条件不严格, 病死畜禽数量较大, 无害化处理水平偏低, 随意处置现象时有发生, 病死畜禽如不进行无害化处理, 可能会传播动物疫病, 甚至引起大规模的畜禽死亡, 造成极大的经济损失, 如丢弃在自然环境中, 极易污染空气、水源等, 或被不法分子加工、贩卖, 而被人食用后, 可能会导致人感染人畜共患病或发生食物中毒事故, 危害公共卫生安全和生态环境安全。

为全面推进病死畜禽无害化处理, 保障食品安全和生态环境安全, 促进养殖业健康发展, 国家要求尽快建设覆盖饲养、屠宰、经营、运输等各环节的病死畜禽无害化处理体系, 但在推进过程中, 病死畜禽无害化处理体系县镇基层建设遇到了重重阻力, 迫切需要努力解决存在问题, 方能推进生态文明建设, 确保“舌尖上的安全”, 促进畜牧业健康发展。

1 目前基层建设病死畜禽无害化处理体系工作中的存在问题

1.1 宣传不到位, 生产经营主体法律意识淡薄

县镇政府及其基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构工作人员在日常工作中, 对《中华人民共和国动物防疫法》及相关的一些病死畜禽无害化处理规定没有持续有效地进行宣传普及, 部分畜禽养殖场户对《中华人民共和国动物防疫法》《病死动物无害化处理技术规范》等知之甚少, 没有详尽了解, 以及法律意识淡薄, 导致畜禽养殖场户、屠宰厂场等生产经营主体根本不重视病死畜禽无害化处理工作, 在源头上产生了真空。

1.2 政府投入经费少, 基层监管力量薄弱

县镇政府对基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构投入不足, 监管工作经费落实不到位, 在病死畜禽无害化处理工作中投入经费少, 导致基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构人员无法有效地针对病死畜禽无害化处理开展大规模的宣传活, 更谈不上进行专业化的培训学习, 无法推进病死畜禽无害化处理场所及病死畜禽集中收集网络建设和更新病死畜禽无害化处理设备。目前基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构工作人员编制少, 监管人员的待遇偏低, 但工作量大, 往往除了

处理动物产地检疫、屠宰检疫外,还有养殖统计备案、技术指导等大量的业务性工作,以致在日常巡查中与畜禽养殖场户的沟通交流非常少,当出现病死畜禽时,畜禽养殖场户并没有向基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构进行报告或者求助,对于病死畜禽的处理只能是随意丢弃或者就地进行掩埋,没有进行彻底的消毒或者焚烧处理等,导致病菌传染传播,导致违法行为随时随地发生,监管难度大,案件调查取证难,违法行为处罚难,收集处理还需要人员工资、机械费用及运输费,基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构还不得不承担掩埋乱抛病死动物的费用。

1.3 以掩埋为主的处理方式隐患大

为了满足防疫需要,养殖场户均远离村庄、居民区等,但部分养殖场户养殖密度大,防疫措施不到位,容易出现大量的病死畜禽,由于缺乏病死畜禽无害化处理常识,不向当地畜牧兽医部门及动物卫生监督机构报告而自行处理,往往采用化尸窖掩埋法等技术水平相对落后、环境污染风险较大的处理方法对病死畜禽进行深埋,但在处理过程中出现掩埋选址不合理、掩埋深度不够、消毒不彻底等问题,致使虽已对病死畜禽进行处理,但仍然对周围环境和地下水源等造成污染,也给动物疫病防控留下隐患,威胁人民群众身体健康。

1.4 缺乏病死畜禽无害化处理场所和收集处理设施

病死畜禽无害化处理场所作为特殊设施建设,存在用地选址难、社会稳定风险评估负面因素多,在选址时常常遇到当地群众以当地水源、土地、空气等受到严重威胁,其生产、生活以及身心健康受到严重影响而反对,还会涉及土地使用规划调整,办理用地手续繁琐,无法在每个县域筹建病死畜禽无害化处理项目,更缺乏配套的病死畜禽收集处理人员、设施设备。

2 强化基层建设病死畜禽无害化处理体系工作的对策

2.1 推进建设病死畜禽无害化处理场所

国家农业主管部门支持和鼓励推广新型高效环保的无害化处理技术和装备,不鼓励继续使用化尸窖掩埋法等技术水平相对落后、环境污染风险较大的处理方法^[2]。推进病死畜禽无害化处理

体系建设,借鉴医疗废弃物等环保废物处理模式,从动物防疫的生物安全管理、处理设施成本投入的集约节约管理有效监管角度,采取高温干化工艺流程等处理方式,着力推进病死畜禽无害化处理场所建设,在开展病死畜禽无害化处理场所项目选址、土地规划调整、财政资金投入、建设项目社会稳定风险评估、建设项目环境影响评价、特许经营权招标等涉及自然资源、生态环境、农业农村等部门行政审批、土地落实、资金投入等,务必要经过多方论证、详细调查、合法审批,利用“社会公益性用地”政策落实病死畜禽无害化处理建设用地,统筹利用信贷、农机购置补贴等优惠政策推进无害化处理场所建设,综合利用农业用电等有利措施推进病死畜禽无害化处理设施的运营。

2.2 建立病死畜禽收集处理运行机制

结合病死畜禽无害化处理场所建设,通过政府购买服务方式,引入企业聘请专业的收集清运队伍,实现定人、定事,不留盲区和死角的人员全面覆盖。配套建设病死畜禽集中收集网络建设,依托畜禽养殖场户、屠宰场、批发市场等在辖区内布局建设病死畜禽收集网点,配备必要的专用运输车、运输袋以及相应的冷库、冷柜等暂存设施。出现病死畜禽时,养殖场要报告当地基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构,由工作人员对死亡畜禽进行初步诊断和报告,畜主或基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构负责收集病死畜禽人员将病死畜禽装入专用装尸袋,及时运送至当地收集点统一收储,同时完善登记台帐及交接流程,在交接过程中,最好留取影像资料,基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构待病死畜禽收集点病死畜禽储满后,迅速通知病死畜禽无害化处理场所专用车辆运送处理,派驻无害化处理场所官方兽医驻点监管,严格病死畜禽无害化处理。

2.3 加大政府经费投入,完善配套保障政策

根据国家对动物疫情防控财政支持政策实施指导意见等文件精神,按照“谁处理、补给谁”的原则,只要确认病死畜禽无害化处理的,均可对相关环节的实施者予以补助,市、县政府要综合考虑病死畜禽收集成本、设施建设成本和实际处理成本等因素,必须将病死畜禽无害化处理经费列入财政预算予以确保经费扶持,确保专项经费准时、足

额到位,无害化处理场所能够实现正常运营。结合保险补贴、实施乡村振兴战略的村庄清治行动等配套支持政策措施,将生猪等动物无害化处理与保险理赔紧密结合,建立动物防疫、无害化处理与保险联动机制,将保险理赔点与无害化处理收集点联合共建,将定损理赔工作与无害化处理工作协同推进,同步落实,推进病死畜禽无害化处理体系建设。

2.4 做好舆论宣传教育,强化生产经营者主体责任

基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构加强病死畜禽无害化处理的舆论宣传,加强健康教育,强化社会舆论监督;通过电视、新媒体和走访入户等多种方式渠道向养殖场户、人民群众宣传病死畜禽的危害性及其无害化处理的重要性,结合重大动物疫病防控,组织生产经营主体参加专题培训班,学习病死畜禽无害化处理技术知识;通过发放告知书,签订动物防疫责任承诺书,督促从事畜禽饲养、屠宰、经营、运输的单位和个人负起病死畜禽无害化处理的首要责任,及时对病死畜禽进行无害化处理并向当地畜牧兽医部门报告畜禽死亡及处理情况,不得抛弃、收购、贩卖、屠宰、加工病死

畜禽;同时增强消费者的安全意识,营造良好的社会氛围,构建病死畜禽无害化处理监管工作“群防群控”的坚实基础。

2.5 依法严厉打击违法犯罪行为

基层畜牧兽医部门及动物卫生监督机构制定病死畜禽无害化处理巡查制度,设置举报热线,推行举报奖励制度,按照《中华人民共和国动物防疫法》《中华人民共和国食品安全法》《畜禽规模养殖污染防治条例》等法律法规及最高人民法院最高人民检察院关于办理危害食品安全刑事案件适用法律若干问题的解释,开展专项行动,强化联合执法,保持高压态势,依法严厉打击随意抛弃病死畜禽、加工制售病死畜禽产品等违法犯罪行为,对依法需要追究刑事责任的,要及时移送公安机关依法立案侦查。

参考文献

- [1] 农业部办公厅.关于印发《2018年畜牧业工作要点》的通知[Z].2018.
- [2] 农业部办公厅.关于病死及病害动物和相关动物产品无害化处理有关问题的函[Z].2017.

上接第24页

4 结语

藏区特色农产品质量提升与流通平台的创建,通过现代物联网及溯源技术为藏区农产品的生产进行层层把关,将有利于改善农产品的生产环境和质量安全,为流通平台及微商平台提供稳定优质的货源,加上电子支付与物流配送服务体系的建立,充分开发藏区特色农产品电商市场,提高当地农产品的销售规模,有效发挥农产品电商在三农工作中的引领带动作用,促进藏区农民的收入与生活水平不断提高,有效推动农业发展新

进程。

参考文献

- [1] 刘海金.西藏农产品质量安全现状与对策[J].当代畜牧,2017,10:70-73.
- [2] 李霞.西藏特色农产品电商发展现状分析[J].现代营销,2018,6:155-157.
- [3] 刘好.西藏发展农产品物流的SWOT分析及应对措施[J].经营管理者,2013,9:82-83.
- [4] 李红.浅析建立农产品质量追溯制度的必要性[J].农民致富之友,2013,3:10.

狂犬病灭活疫苗(dG株)在茂名地区应用效果分析

薛素强¹, 李冰², 陈盛絮², 唐旭麒¹, 刘庚明¹, 林颖仪³, 郭霄峰³

(1. 广州市华南农大生物药品有限公司, 广东 广州 511300;

2. 茂名市动物疫病预防控制中心, 广东 茂名 525099;

3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:优质狂犬病疫苗的推广和应用是预防狂犬病的重要手段。狂犬病灭活疫苗(dG株)由华南农业大学研制, 广州市华南农大生物药品有限公司生产。本研究以该疫苗免疫广东省茂名市茂南区联塘村全部犬, 之后随机采集免疫后0日, 3个月和12个月犬的血清60份, 进行狂犬病抗体检测。结果显示, 免疫后3个月, 狂犬病抗体阳转率由45.00%, 提高至90.00%; 免疫后12个月, 抗体阳转率仍维持在80.00%。研究表明, 狂犬病灭活疫苗(dG株)是一种安全高效的犬用狂犬病疫苗。

关键词:狂犬病灭活疫苗(dG株); 犬; 狂犬病; 抗体

中图分类号:S855.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8567(2019)04-0032-04

狂犬病是由狂犬病病毒侵害中枢神经系统而引起的一种急性致死性人兽共患传染病, 病死率高达100%^[1]。狂犬病病毒几乎能感染所有温血动物^[2], 犬在病毒的传播中起重要作用。随着城乡犬饲养数量的增多, 给我国2030年消灭狂犬病提出了挑战。优质狂犬病疫苗是控制狂犬病的重要手段。2017年8月, 广州市华南农大生物药品有限公司联合茂名市动物疫病控制中心在茂名市茂南区联塘村开展“科技下乡”活动, 使用狂犬病灭活疫苗(dG株)免疫联塘村全部家养犬, 以评价狂犬病灭活疫苗(dG株)的免疫效果, 为后续狂犬病防控过程中疫苗的选择提供重要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 疫苗

狂犬病灭活疫苗(dG株), 500头份, 批号: 1609108, 有效期至: 2017年9月12日, 由广州市华南农大生物药品有限公司生产和提供。

1.2 试验动物

茂名市茂南区联塘村全部家养犬493头。

1.3 疫苗免疫及血清采集

按狂犬病灭活疫苗(dG株)的使用说明书进行。3月龄以上健康犬, 每头注射疫苗1头份, 之后免疫犬分散在农户家按原状态饲养。于免疫当日, 免疫后3个月和12个月随机抽取免疫犬60头, 经前肢静脉采血液、分离血清。

1.4 狂犬病抗体检测

样品采集后冷藏运送至华南农业大学兽医微生物实验室(CNAS认证狂犬病抗体检测实验室)以ELISA方法检测免疫犬的狂犬病抗体。所用试剂为SYNBIOTICS生产的ELISA试剂盒。

1.5 结果判定

参照OIE陆生动物诊断试验与疫苗手册^[3], 抗体滴度 ≥ 0.6 EU/mL判为保护和抗体阳转。

2 结果

2.1 免疫数量

本次将狂犬病灭活疫苗(dG株)经颈部皮下免疫茂名市茂南区联塘村全部家养犬, 共计493头。

收稿日期: 2019-02-21

项目来源: 华南农业大学高水平大学建设专项资金 No 219290

作者简介: 薛素强(1980-), 男, 广东清远人, 硕士, 主要从事疫病诊断与狂犬病疫苗推广应用工作。E-mail: 57396910@qq.com

2.2 抗体滴度与抗体阳转率

试验采集样本范围内,免疫当天仅有27头犬的抗体滴度达到或超过0.6 EU/mL,抗体阳转率仅为45.00%,平均抗体滴度2.39 EU/mL。免疫3个月后,

抗体阳转的犬达到54头,抗体阳转率提高到90.00%,平均抗体滴度为5.37 EU/mL。免疫12个月后,抗体阳转的犬仍有48头,抗体阳转率维持在80.00%,平均抗体滴度为3.55 EU/mL(表1、表2和图1)。

表1 茂名市茂南区联塘村犬狂犬病抗体滴度情况

样品编号	免疫后时间					
	免疫前		免疫后3个月		免疫后12个月	
	OD值	抗体滴度(EU/mL)	OD值	抗体滴度(EU/mL)	OD值	抗体滴度(EU/mL)
1	0.266	0.35	0.487	1.25	0.218	0.16
2	0.373	0.71	0.386	0.76	1.18	3.26
3	0.341	0.59	0.265	0.34	1.228	3.5
4	0.244	0.29	2.251	32.03	0.563	0.88
5	0.238	0.27	0.538	1.54	2.414	11.6
6	0.339	0.58	1.244	9.12	2.04	8.6
7	0.271	0.36	0.251	0.31	0.555	0.86
8	0.228	0.25	0.855	4.12	0.871	1.9
9	0.623	2.11	2.364	35.53	1.519	5.1
10	0.871	4.28	0.601	1.95	0.669	1.19
11	0.579	1.8	1.223	8.79	1.714	6.32
12	0.474	1.18	0.608	2	0.425	0.53
13	0.509	1.37	0.55	1.62	1.908	7.64
14	0.257	0.32	0.492	1.28	0.506	0.73
15	0.36	0.66	0.751	3.13	2.146	9.41
16	0.245	0.29	0.984	5.55	2.054	8.71
17	0.464	1.13	0.418	0.9	0.305	0.3
18	0.286	0.4	0.245	0.29	0.384	0.45
19	0.282	0.39	0.882	4.4	1.395	4.39
20	0.29	0.42	1.08	6.76	2.58	13.05
21	0.267	0.35	1.107	7.12	2.493	12.28
22	0.481	1.22	0.459	1.1	1.572	5.42
23	0.238	0.27	0.64	2.23	0.827	1.74
24	0.99	5.62	0.342	0.59	0.874	1.91
25	1.405	11.8	0.901	4.6	0.427	0.54
26	0.92	4.81	0.879	4.37	0.615	1.03
27	0.259	0.33	0.629	2.15	0.236	0.19
28	0.472	1.17	0.952	5.17	1.222	3.47
29	1.663	16.86	0.507	1.36	0.506	0.73
30	0.428	0.95	0.547	1.6	1.479	4.86
31	0.308	0.47	1.566	14.85	0.852	1.83
32	0.388	0.77	1.263	9.41	0.86	1.86
33	0.374	0.71	0.279	0.38	1.496	4.96
34	0.24	0.28	1.514	13.82	0.595	0.97

续表

样品编号	免疫后时间					
	免疫前		免疫后3个月		免疫后12个月	
	OD值	抗体滴度(EU/mL)	OD值	抗体滴度(EU/mL)	OD值	抗体滴度(EU/mL)
35	0.182	0.16	1.337	10.62	1.166	3.19
36	0.278	0.38	0.775	3.34	0.273	0.24
37	0.202	0.19	0.445	1.03	0.436	0.56
38	0.247	0.3	0.973	5.42	0.467	0.63
39	0.865	4.22	0.856	4.13	0.365	0.41
40	0.235	0.27	0.589	1.87	0.268	0.24
41	1.183	8.2	0.386	0.76	0.62	1.04
42	0.242	0.28	0.431	0.96	0.59	0.95
43	1.902	22.41	0.407	0.85	0.336	0.35
44	0.474	1.18	1.086	6.84	0.938	2.17
45	0.313	0.49	0.614	2.04	1.349	4.13
46	0.485	1.24	0.571	1.75	1.591	5.54
47	0.278	0.38	0.21	0.21	0.715	1.34
48	0.236	0.27	0.577	1.79	2.131	9.3
49	0.236	0.27	1.031	6.12	0.398	0.47
50	0.182	0.16	2.037	25.92	0.722	1.36
51	0.444	1.03	1.919	22.84	0.793	1.61
52	0.234	0.26	0.415	0.89	1.319	3.97
53	0.263	0.34	1.356	10.94	1.12	2.97
54	0.534	1.52	1.429	12.23	2.401	11.49
55	0.257	0.32	0.546	1.59	2.401	11.49
56	0.668	2.44	0.675	2.5	1.356	4.17
57	0.243	0.29	0.357	0.65	0.631	1.07
58	0.959	5.25	0.626	2.13	0.73	1.39
59	2.105	27.79	0.716	2.83	0.557	0.86
60	0.226	0.25	0.514	1.4	0.924	2.11

表2 茂名市茂南区联塘村犬狂犬病抗体滴度情况

免疫前		免疫后3个月		免疫后12个月	
平均抗体滴度(EU/mL)	阳转率(≥ 0.6 EU/mL)	平均抗体滴度(EU/mL)	阳转率(≥ 0.6 EU/mL)	平均抗体滴度(EU/mL)	阳性转率(≥ 0.6 EU/mL)
2.39 \pm 5.17	45.00%(27/60)	5.37 \pm 7.42	90.00%(54/60)	3.55 \pm 3.69	80.00%(48/60)

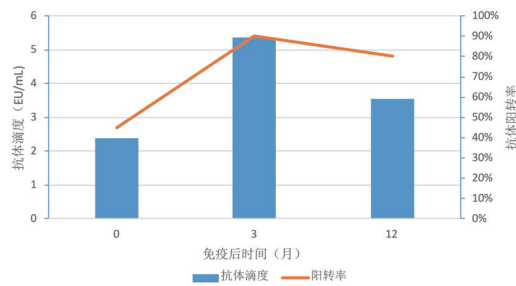


图1 茂名市茂南区联塘村犬狂犬病抗体滴度情况

2.3 临床发病情况

茂南区联塘村2017年9月至2018年12月未有犬狂犬病发病报道。

3 分析与讨论

3.1 疫苗有效性

狂犬病灭活疫苗(dG株)在实验室条件下能产生较高抗体滴度和抗体阳转率^[4-5],但因田间饲养条件的差异,抗体阳转率稍低^[5],但也大大超过了OIE推荐的70%^[3]。该疫苗在田间对农村家养犬经1头份/头一次免疫,再次确证免疫后能快速产生抗体,抗体阳转率高;免疫后12个月抗体滴度达3.55 EU/mL,抗体阳转率为80.0%,明显高于OIE要求标准。徐彬等^[6]对深圳南山区犬猫狂犬病抗体进行了调查,发现深圳市经过10年连续使用进口狂犬病灭活疫苗免疫,2017与2018年的强制免疫一个月抗体阳转率分别为81.03%和87.05%,与狂犬病灭活疫苗(dG株)免疫后12个月效果相当。而深圳市南区免疫犬猫后12个月狂犬病抗体阳转率仅为43.72%^[6],远远低于70%的保护要求,亦远远低于狂犬病灭活疫苗(dG株)免疫后12个月的水平。

3.2 疫苗安全性

按1头份/头一次免疫493头犬,观察12个月,没有发现免疫犬死亡、休克、过敏反应等问题,表明该产品试验条件下安全,可以用于犬的免疫。

3.3 免疫程序的调整

使用该疫苗的免疫程序可调整为首次免疫仅需一针,一年免疫一次。相对其他国产狂犬病灭活疫苗,首次免疫需要2次。防疫人员需要甄别犬是否为首次免疫,然后3周再次重复一次,免疫过程费事和费力。因此,本研究可以提高免疫工作效率。

4 小结

本研究证明狂犬病灭活疫苗(dG株)是一种安全高效的犬用狂犬病疫苗,使用本疫苗可以提高免疫工作效率。

参考文献:

- [1] 陶田谷晟,杨显超,吴秀娟,等.上海地区犬类主要疫病血清学调查[J].上海畜牧兽医通讯,2017(3):24-25.
- [2] 肖璐,王忠田,滕颖,等.狂犬病的流行现状和防控措施[J].中国兽药杂志,2010,44(9):53-57.
- [3] 世界动物卫生组织(OIE)编著,农业部兽医局组译. OIE陆生动物诊断试验与疫苗手册(哺乳动物、禽类与蜜蜂)[M]. 2012第七版.
- [4] 孙招金,薛素强,刘晓慧,等.ELISA与FAVN方法检测犬狂犬病抗体的比较[J].中国预防兽医学报,2003,(3):204-206.
- [5] 施赫赫,宋伟科,黄永亮,等.狂犬病基因工程灭活疫苗(Hep-Flury-dG株)的免疫效力[J].中国人兽共患病学报,2012,28(7):664-668.
- [6] 徐彬,陈言,张柳瞻,等.深圳南山区犬、猫狂犬病抗体及病原检测分析[J].广东畜牧兽医科技,2019,44(1):38-39.

上接第21页

- [4] 戚敏.面向高校用户的嵌入式学科服务模式探究——以广西科技大学为例[J].图书馆界,2015(02):13-16.
- [5] 周秀会,邹金汇.基于意义建构理论的信息行为质性研究——以天津工业大学纺织学科科研人员为例[J].图书馆工作与研究,2015(12):85-88.
- [6] 高颖.基于科研信息行为的学科服务实践[J].图书情报工作,2017,61(S2):60-64.

- [7] 程艾军.基于有效信息行为的医学院校学科服务模式研究[J].医学信息学杂志,2018,39(07):70-73.
- [8] 郭岚,孙玲,李欣.泛在知识环境下嵌入式中药学学科服务的实践[J].时珍国医国药,2016,27(05):1232-1233.
- [9] 陈乐明,王瑞菊.从博士学位论文的引文看其文献需求[J].图书馆理论与实践,1995(01):18-21.
- [10] 邓智心.研究生兼职参与学科服务的实践探索与分析[J].图书情报工作,2016,60(16):93-98.

三例剑羚幼仔腹泻病的诊治报告

张天佑¹, 马祥^{2*}

(1.广州长隆野生动物世界, 广东 广州 511430

2.北京爱德士元亨生物科技有限公司, 北京 100301)

摘要:在广州长隆野生动物世界现有饲养条件下, 剑羚幼仔出生一月内很容易发生腹泻。本试验针对剑羚仔出现腹泻后区别不同症状分别用药进行研究。结果表明:一般情况下, 剑羚仔的腹泻是由于气候变化等原因引起肠道菌群紊乱, 及时口服妈咪爱和思密达, 三天后病情明显好转, 一周内收效满意;当继发感染肠炎后, 适当给予抗感染、调整酸碱平衡、补充水分和调解电解质等治疗方案亦能收到良好效果。

关键词:剑羚幼仔; 腹泻; 菌群紊乱; 肠炎

中图分类号:S856.4 **文献标识码:**B **文章编号:**1005-8567(2019)04-0036-02

剑羚(Gemsbok), 原产于非洲, 一般九月至次年的一月产仔, 而在我国一年四季均有产仔的情况。剑羚仔出生一月内, 尤其是在雨季, 很容易发生腹泻, 排出乳白色奶粪, 粪便由软变稀, 最后成黄色水样粪便。如发现和治疗不及时, 常因继发感染导致死亡。本研究旨在分析剑羚仔处于腹泻症状, 启用药物进行治疗, 从而找出一套治疗剑羚仔腹泻的技术措施, 为剑羚及其它非洲羚羊幼仔腹泻病的诊疗提供有价值的参考。

1 材料和方法

1.1 试验动物及试验时间

人工饲养的剑羚幼仔3只(7日龄到15日龄)。3只剑羚幼仔分别在出生后7日龄(1号幼仔)、10日龄(2号幼仔)、15日龄(3号幼仔)发生腹泻。试验时间:2017年2月1日至9月30日。

1.2 药品

思密达(蒙脱石散)、妈咪爱、氨苄西林钠舒巴坦钠、ATP、VC、VB6、辅酶A、复方氯化钠、5%GNS、5%GS、5%碳酸氢钠、阿托品、氯化钾和止血敏。

1.3 实验室检查

1.3.1 基本检查:1号、3号剑羚幼仔体况中等, 能观察到吃母乳, 较早前被雨水浇湿全身, 均有排出乳白色糊状奶粪, 粪便中带少量粘液和泡沫, 粪便镜检可发现大量未消化的母乳团块;体温38.5~39℃, 呼吸12~20次/min, 心跳80~85次/min;白细胞5600个/ μL , 红细胞600万个/ μL , 血红蛋白10 g/dL。根据上述症状初步诊断为受凉后肠道菌群紊乱引起的消化不良症。处方是思密达、妈咪爱各两袋, 口服。为减少应激, 一日服药一次。

2号幼仔剑羚仔体型较瘦, 排出黄色水样粪便, 粪便中带粘液, 肛门毛发脏乱, 四肢无力, 喜卧, 未见吃母乳;由于连日大雨, 多次被大雨淋湿全身;体温39.9℃, 心跳123次/min, 呼吸28次/min;白细胞7350个/ μL , 红细胞810万个/ μL , 血红蛋白10 g/ μL 。因怀疑有肠炎遂收集新鲜粪便作细菌培养, 并作细菌分离鉴定和药敏试验, 如图1~4所示(图见第52页)。

1.3.2 粪便细菌培养:采集新鲜粪便接种于血液培养基上培养, 37℃下24 h后长出灰白色、表面光滑、边缘整齐的菌落。取培养基上的菌落作革兰氏

收稿日期:2018-12-11

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

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

染色,镜检结果为革兰氏阴性菌,镜下可见菌端钝圆,多数为单个的小杆菌。

1.3.3 培养菌生化试验:取血液培养基上的典型菌落接种于麦康凯琼脂平板上进行纯培养,34℃下24h后取菌落进行生化试验,结果均发酵分解葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、鼠李糖、阿拉伯糖,产酸产气,不分解尿素,M.R.试验阳性,吲哚试验阳性,甲基红反应阳性,VP试验和枸橼酸盐利用试验均为阴性,不产生H₂S气体。由大肠杆菌分型血清作分型为致病性大肠杆菌。

1.3.4 药敏试验:采用纸片扩散法。氨苄西林钠/舒巴坦钠、头孢哌酮钠/舒巴坦钠、环丙沙星、恩诺沙星最为敏感;阿米卡星、氯霉素、头松曲松、痢特灵次之;青霉素、庆大霉素不敏感。

1.4 治疗

根据临床症状和实验室检查诊断为致病性大肠杆菌引起的肠炎,同时该群剑羚仔伴有脱水,估重10kg,按60mL/kg体重的液体量静脉给药(表1)。为减少应激,每日给药一次。

表1 试验治疗处方

药物	用量	给药方式
5%GNS	100 mL	I.V.
氨苄西林钠舒巴坦钠	0.75 g	I.V.
5%GS	200 mL	I.V.
ATP	20 mg	I.V.
VC	1 g	I.V.
VB6	100 mg	I.V.
辅酶A	50 U	I.V.
氯化钾	0.6 g	I.V.
复方氯化钠	200 mL	I.V.
5%碳酸氢钠	100 mL	I.V.
阿托品	0.25 mg	I.H.
止血敏	1 mL	I.M.
思密达	2袋	P.O.

1.5 疗效判定

根据剑羚仔不同症状分别用药,坚持跟进治疗,以病情逐渐好转,直至稳定为有效,否则为无效,需重新设定治疗方案。

2 试验结果

根据3只剑羚仔不同症状分别用药,三天后病

情明显好转,粪便由稀逐渐变为团块状,继而变为颗粒状,体温也逐渐恢复到39℃。剑羚仔精神均转为正常,四处跑动,主动吃奶。坚持巩固治疗,直到第七日,停止用药,一个月后观察状态稳定。

3 讨论

3.1 剑羚仔腹泻病原因分析

剑羚仔出生时肠道内是无菌的,经2~4h后有大量细菌进入繁殖,细菌种类和数量随着剑羚的年龄、饲料、以及剑羚与细菌之间相互作用而发生变化,构成一定的微生态平衡^[1,2]。同时,肠道内的菌群之间按一定比例存在,相互制约,相互依存。新生剑羚仔肠黏膜发育不全,胃液酸度小,酶的活性低,在不良条件作用下(如遇天气变化受凉后),某些细菌繁殖明显过量引起肠道菌群紊乱,进入胃肠的内容物容易出现分解不全而发酵,发酵产生的中间产物刺激肠道蠕动加快,临床上表现为急性或慢性腹泻。当肠道菌群紊乱进一步加重时,肠道消化功能紊乱使食糜的氢离子浓度改变,为一些病原微生物(包含机体内异常增多的细菌和外界入侵的病原微生物)创造了有利于繁殖的环境。由于病原菌的大量繁殖,其产生的各种毒素不断刺激肠道粘膜屏障,致使腹泻进一步加剧。机体表现出脱水、电解质紊乱、酸碱失衡等状况,甚至引起各种继发感染,最终导致动物休克、死亡。

3.2 药物作用机理

妈咪爱含有枯草杆菌和屎肠球菌,可调节动物肠道环境,促进肠道正常菌群的生长繁殖,抑制肠道致病菌的生长,从而有效地保护肠道。思密达的主要成分是蒙脱石粉,它具有层纹结构及非均匀电荷分布,对消化道内的病毒、病菌及其产生的毒素有固定、抑制作用,对消化道粘膜有覆盖能力,并通过与粘液糖蛋白相互结合,从质和量两方面修复,提高粘膜屏障对攻击因子的防御功能^[3]。妈咪爱与思密达的联合应用,能够及时清除有害物质,有效地调整肠道菌群平衡,促进腹泻的恢复。另外,妈咪爱还含有动物成长必需的维生素B₁、B₂、B₆、B₁₂,维生素C及烟酰胺等维生素,以及微量元素锌和矿物质钙,有利于肠道功能的恢复。

一例犬腹膜心包横膈疝的诊断

张学辉¹, 刘恒群^{2,3}, 陈义洲^{2,3*}

(1. 深圳市福田区动物防疫监督所, 广东 深圳 518049;

2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

3. 广州市华农大动物医院有限公司, 广东 广州 510642)

摘要:犬腹膜心包横膈疝在兽医临床并不是一种常见的疾病, 多是先天心包膜和腹腔之间发育不良导致, 也偶见于外伤后导致。通常都是在进行其它检查时偶然发现, 需要与心包积液、横膈疝等进行鉴别诊断。本文通过介绍一例犬腹膜心包横膈疝的诊断过程, 并对相关文献进行回顾和总结, 为犬腹膜心包横膈疝的临床诊治提供参考。

关键词:犬; 腹膜心包横膈疝; X光; 超声

中图分类号:S857.1 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)04-0038-03

腹膜心包横膈疝(Peritoneopericardial diaphragmatic hernia, PPDH)是一种先天性的心包囊和腹腔之间的连通, 导致腹腔脏器进入到心包囊内。曾有外国研究学者对两家教学动物医院的腹膜心包横膈疝患病动物进行统计, 发现该病发病率为0.025%, 其中狗患病率0.015%, 猫0.062%, 总体发病率低, 且发病没有性别偏好^[1]。临床上主要表现为呕吐、运动不耐受和呼吸窘迫。诊断主要是基于影像学检查, 外科修复是临床患病动物的首选治疗方法, 且术后一般预后良好。

1 病史及临床症状

2岁雄性未绝育法国斗牛犬, 体重10.3 kg, 体温39.3℃。主诉因血尿在其他医院进行X光检查时意外发现心脏轮廓增大, 怀疑有心脏性疾病, 患犬从小有间断性呕吐症状, 不能进食大颗粒狗粮, 性格安静, 不喜叫。

2 临床检查

2.1 基本检查

患犬体格偏瘦(3/9), 可视粘膜颜色偏淡, 毛细血管再充盈时间小于2秒, 食欲、饮水情况正常, 大

便正常偏软, 血尿, 血压正常。听诊肺音正常, 在胸壁偶闻肠蠕动感, 右侧未闻心音, 左侧听诊心音弱, 但未闻心杂音、心律不齐。

2.2 心电图检查

心电图检查结果显示电压正常, 窦性心律不齐, P波振幅变化较明显, 呈游走性P波, 平均心电图轴左移。

2.3 B超检查

心脏超声检查在心包内可见多个条索样小肠影像, 肠壁分层清晰, 未见明显增厚, 肠道未见明显扩张。心脏位置明显改变, 左侧胸骨旁心尖部切面二尖瓣、三尖瓣、主动脉瓣未见异常, 未见反流, 二尖瓣E波大小为91.9 cm/s, A波大小为53.2 cm/s, E/A为1.73, 主动脉流速约为1.35 m/s, 左心房左心室未见明显扩张, 右心房及右心室稍增大, 左心室收缩功能尚可。超声提示该犬患有心包疝, 疝内容物为小肠; 心脏位置改变; 右心房及右心室稍有增大, 心脏其余部分未见明显结构异常。超声检查结果图见图1。

对患犬进行腹腔超声探查, 检查结果提示犬患有胆汁淤积、膀胱炎、膀胱结石(中量, 细沙样)、脾脏肿大及横膈部分缺失, 导致小肠移位至胸腔内, 形成心包疝内容物。超声诊断图如图2所示。

收稿日期:2019-08-09

作者简介:张学辉(1971-), 畜牧兽医专业, 助理兽医师, 常年从事动物防疫检疫工作。E-mail:1319388241@qq.com

*通讯作者:陈义洲(1977-), 男, 博士, 兽医师, 主要从事宠物疾病及寄生虫病研究。E-mail:ofloxacin@163.com

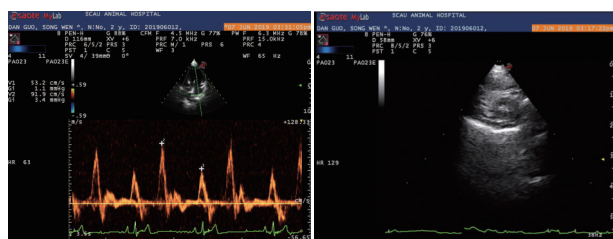


图1 心脏超声影像

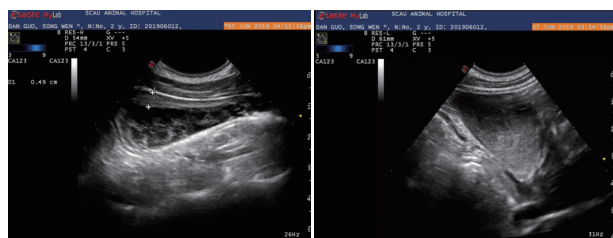


图2 腹部超声影像

2.4 X线检查

胸腔X线平片检查,侧位片可见心脏边缘消失,气管向背侧移位,肺前叶及心脏位置可见条索状低密度影像,内含气体,腹侧横膈边缘消失;背腹位片可见心脏增大,在心脏位置可见条索状低密度影像,心脏与横膈顶影像重叠,肺不透明度未见异常。消化道钡餐造影后1分钟、15分钟和30分钟分别拍摄胸腔X线正侧位,可见在胸腔心脏位置有钡剂影像,所有钡剂均局限在心脏范围内,X线检查结果诊断为心包疝。如图3所示。

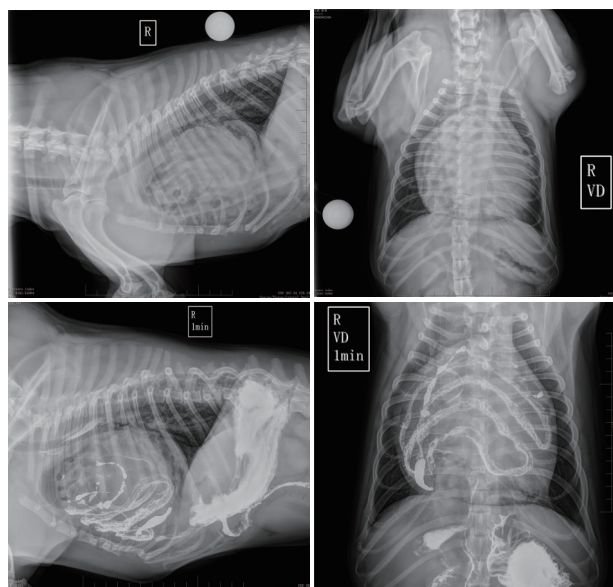


图3 X射线检查

3 其他检查

在其他医院检查尿血原因时,进行了血液常规和血清生化检查。血常规检查结果中只有中性粒细胞比率轻微上升,其他指标均正常,生化检查所有指标均正常。

4 诊断与治疗

根据超声检查及X线检查结果,诊断为犬心包横膈疝,疝的内容物为小肠。鉴于手术风险,主人选择保守治疗,采取喂湿软的狗粮,尽量减少动物的剧烈运动等方式。截止目前,该犬生活一切正常。

5 讨论

腹膜心包横膈疝是一种较少见的疝,主要表现为腹部器官进入到心包囊内,疝的内容物可能为肝脏、小肠、胆囊、网膜、脾脏、结肠、胰腺和镰状韧带等腹腔脏器^[1,2],当疝内容较少时,患犬不表现临床症状,一般是进行体检时偶然发现。临床症状主要取决于疝内容物的种类及数量,可表现为厌食、呕吐、运动不耐受和呼吸窘迫,其他症状包括嗜睡、体重减轻、腹泻、咳嗽或虚脱^[1,2]。但犬猫的临床症状中有细微的差别,猫还可能并发心肌病、肾功能衰竭、呼吸道感染、心包囊肿和积液、多囊肾、甲状腺功能亢进、尿道阻塞、乳糜胸、癫痫、糖尿病、线状异物、肠套叠、胃肠炎等^[2,4]。体格检查中,最常发现的临床症状包括心脏杂音,心音减弱,右边听不到心音,左边听到微弱的心音^[1,2]。血清生化检查犬猫常见血清丙氨酸氨基转移酶活性升高,可能与疝对肝脏或胆囊的刺激有关,另外在猫中最常见血清钙离子增加^[1,2]。

动物的腹膜横膈疝发生的原因有先天性和后天性,但在正常犬猫中,心包和横膈膜没有连接,因此,不可能发生创伤性的腹膜横膈疝,一般都是先天性造成^[5]。先天性的腹膜心包横膈疝被认为是由横膈发育不全引起,引起发育不全的可能原因包括遗传缺陷、产前损伤和致畸剂^[4,6]。

腹膜心包横膈疝的诊断以影像学检查为主,在X光平片中可见心脏轮廓增大或消失,气管向背侧移位,横膈腹侧部分边缘消失,心包囊内可见肠道、肝脏等腹部器官影像。超声检查可在胸腔和心脏位置发现腹腔器官影像,如果怀疑内容物为胃肠道,还

可进行消化道钡剂造影。

该病的首选治疗方案是外科手术修复,一般术后效果良好。术中并发症主要见于猫,包括与肝、心包或心肌粘连有关的出血、低血压、呼吸性酸中毒、通气不足、缺氧和多灶性室前性综合征^[1, 2, 4]。猫和狗都有术后并发症,但狗一般较少,主要并发症有术部切口裂开、心包脂肪炎或气胸;猫在术后主要并发高热、呼吸暂停、呼吸困难、通气不足、持续性酸中毒、缺氧、难治性气胸、胸腔积液、肺水肿、呼吸暂停、乳糜胸、伤口裂开、疝复发和部分失明^[1, 2, 4]。

对手术治疗延长动物存活率方面的统计表明,接受手术修复和未修复的动物存活率没有差异^[1, 7]。因此,当腹膜心包横膈疝没有严重影响动物生活质量时,可选择保守治疗,还可避免术中和术后的并发症。

参考文献

- [1] BURNS C G, BERGH M S, MCLOUGHLIN M A. Surgical and nonsurgical treatment of peritoneopericardial diaphragmatic hernia in dogs and cats: 58 cases (1999-2008)[J]. Journal of the American

Veterinary Medical Association, 2013, 242(5):643-50.

- [2] BANZ A C, GOTTFRIED S D. Peritoneopericardial diaphragmatic hernia: a retrospective study of 31 cats and eight dogs[J]. Journal of the American Animal Hospital Association, 2010, 46(6): 398-404.
- [3] BOGE G S, ENGDahl K, MOLDAL E R, et al. Cranial cruciate ligament disease in cats: an epidemiological retrospective study of 50 cats (2011-2016)[J]. Journal of Feline Medicine & Surgery, 2019: p.1098612X19837436.
- [4] REIMER S B, KYLES A E, FILIPOWICZ D E, et al. Long-term outcome of cats treated conservatively or surgically for peritoneopericardial diaphragmatic hernia: 66 cases (1987-2002)[J]. Australian Veterinary Journal, 2004, 82(9):728-732.
- [5] GUSTAF R B, ANITA T. Peritono-pericardial diaphragmatic hernia in a dog[J]. Modern Veterinary Practice, 2010, 11(9):585-590.
- [6] EVANS S M, BIERY D N. Congenital peritoneopericardial diaphragmatic hernia in the dog and cat: a literature review and 17 additional case histories[J]. Veterinary radiology and ultrasound, 1980, 21(3):108-116.
- [7] WALLACE J, MULLEN H S, LESSER M B. A technique for surgical correction of peritoneal pericardial diaphragmatic hernia in dogs and cats [J]. Journal of the American Animal Hospital Association, 1992, 28(6):503-510.

上接第37页

3.3 治疗体会

当剑羚仔刚开始出现排乳白色粪便而无其它症状时,单用思密达和妈咪爱妈能收到良好效果,此时若没有证据表明幼仔确实有细菌感染,不宜随意使用抗菌素。因为在肠道菌群紊乱的初期,抗菌素的介入不仅不利于菌群的平衡调整,反而会加重这种紊乱的程度。

在实际工作中,引起幼仔感染性腹泻的病原微生物多种多样^[4],因此,病原学诊断对于合理利用抗生素具有重要指导意义。在条件允许的情况下,治疗方案要尽量根据致病菌和药敏试验的结果来制定,这样可迅速控制病情,加快恢复;当条件不允许时,或者在细菌培养、药敏试验结果出来之前,主治兽医可根据仔兽的症状、感染的性质制定经验性的治疗方案,而治疗的关键点就是维持水和电解质的平衡。

4 结论

当剑羚仔因天气变化等原因引起腹泻症时,一般情况下是由于肠道功能不适,导致菌群紊乱,此时使用思密达和妈咪爱就能收到良好效果。当出现感染的情况下,采取适当使用抗菌素、调节酸碱平衡、维持水和电解质平衡等治疗方案亦能迅速促进恢复。

参考文献

- [1] 杨玉荣,郑世民,姜义宝. 微生态制剂对肠道菌群紊乱的调节作用[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(3):50-51.
- [2] 张鑫,马丽苹,张芸,等. 茶叶儿茶素对肠道微生物生态的调节作用[J]. 食品科学, 2013, 34(5):232-237.
- [3] 张申亮. 蒙脱石散剂用于治疗儿科消化系统疾病的新进展[J]. 中国药房, 2008, 19(26):2066-2068.
- [4] 王勇. 感染性腹泻预防控制对策与实验室监测的研究[D]. 博士学位论文. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2007.

猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株) 冻融后稳定性研究

胡美容, 郑铁锁, 陈坚, 黄秋雪, 穆光慧*
(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东广州 511356)

摘要:为了探究猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)-70℃冻融后性状是否改变,本试验研究将GD0503株与白油佐剂以不同水油比、与含有不同比例硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗,以及GD0503株不同抗原含量与白油佐剂乳化的疫苗,分别置-70℃冻融1次和冻融3次进行稳定性检测;同时也选取了不同公司不同类型的油佐剂疫苗10种,与猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)分别置-70℃冻融1次进行稳定性检测。结果表明:(1)GD0503株与白油佐剂以不同水油比(1:1.5、1:2和1:3)乳化的疫苗、与含有不同比例硬脂酸铝(0、1.0%、1.2%和2.0%)的白油佐剂乳化的疫苗和不同抗原含量与白油佐剂1:2乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次管底均无明显水相析出,不破乳;(2)不同公司的10种油佐剂疫苗在-70℃冻融1次后有7种发生破乳,猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)和另外3种疫苗性状保持不变。上述结果证实,我们制备的猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)在-70℃保存后性状保持不变(不破乳)。

关键词:猪肺炎支原体灭活疫苗; 冻融; 破乳

中图分类号:S852.5 文献标识码:A 文章编号:1005-8567(2019)04-0041-06

Stability of inactivated vaccine against *Mycoplasma Pneumoniae* (GD0503 strain) after freeze-thaw

Hu Meirong, Zheng Tiesuo, Chen Jian, Huang Qiuxue, Mu Guanghui
(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 511356, China)

Abstract: In order to explain why swine mycoplasma pneumoniae inactivated vaccine (GD0503 strain) remained unchanged in characters after freeze-thaw at -70℃, two experiments were conducted. In the first experiment, we explored the stability of vaccine emulsified with strain GD0503 and white oil adjuvant at different water-oil ratios, vaccine emulsified with strain GD0503 and white oil adjuvant containing different proportion of aluminum stearate, and vaccine emulsified with Strain GD0503 of different content and white oil adjuvant after single freeze-thaw and triple freeze-thaw at -70℃ respectively. In the second, ten different oil emulsion adjuvant vaccines from different companies and swine mycoplasma pneumoniae inactivated vaccine (GD0503 strain) were detected the stability after freeze-thaw at -70℃ once. The results showed that: (1) During the first experiment, we examined the stability of vaccine emulsified with strain GD0503 and white oil adjuvant at different WOR (1:1.5, 1:2 and 1:3), vaccine emulsified with strain GD0503 and white oil adjuvant containing different proportion of aluminum stearate (0%, 1.0%, 1.2% and 2.0%), and vaccine emulsified with strain GD0503 of different content and white oil adjuvant (at a ratio of

收稿日期:2019-04-22

作者简介:胡美容(1985-),女,硕士研究生,主要从事畜禽动物疫苗的研究。E-mail:humeirong0907@126.com

*通讯作者:穆光慧(1982-),女,硕士研究生,主要从事畜禽动物疫苗的研究。E-mail:muguanghui109@126.com

1:2) after single freeze-thaw and triple freeze-thaw at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectively and no demulsification and distinct precipitation of water phase was observed at the bottom of all tubes. (2) During the second experiment, demulsification was observed in 7 of the 10 oil emulsion adjuvant vaccines, while the swine mycoplasma pneumoniae inactivated vaccine (GD0503 strain) and other 3 vaccines remained unchanged in characters. Based on above results, it was concluded that the swine mycoplasma pneumoniae inactivated vaccine (GD0503 strain) we prepared could remain unchanged in characters after freeze-thaw at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no demulsification).

Keywords: Inactivated Vaccine against Mycoplasmal Pneumonia of Swine; Freeze-thaw; Demulsification

本公司研制的猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)通过检测疫苗中的相对效力来评价成品疫苗的效力^[1],参考疫苗作为标准物质,通过大量的实验证明了该替代方法和本动物攻毒效力检验方法存在一定的平行关系。参考疫苗的保存期的长短主要取决于疫苗的稳定性的,为了延长参考疫苗的保存期,我们将参考疫苗放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,且经过大量的研究数据表明,参考疫苗 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存后,疫苗的稳定性和免疫原性与初始产品均无明显差异。一般地,我们认为灭活疫苗不宜冻结,冻结后易发生破乳,但是我们制备的参考疫苗在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 能稳定保存,且冻融后不发生破乳,为了解释这种现象。本试验从GD0503株与白油佐剂以不同水油比乳化的疫苗、与含有不同比例硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗以及不同抗原含量与白油佐剂乳化的疫苗在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次来考察疫苗稳定性^[2]。同时,也选取了不同公司不同种类的油佐剂疫苗10种,与参考疫苗分别置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次进行稳定性检测。

1 材料

1.1 抗原

制备猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)的抗原由广东永顺生物制药股份有限公司项目组提供。

1.2 试剂

白油 MARCOL 52购自法国埃索公司,吐温-80和司本-80购自新加坡 CRODA 公司, Tris-NaCl 由广东永顺生物制药股份有限公司提供。

1.3 匀浆机

T25型,德国 IKA 公司产品。

2 方法

2.1 不同水油比乳化的疫苗 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次的稳定性检测

分别以 Tris-NaCl 和猪肺炎支原体(GD0503株)为抗原与含2%硬脂酸铝的白油佐剂以水油比1:1.5、1:2、1:3进行乳化。每组疫苗乳化后进行剂型和稳定性检测,合格后定量分装,10 mL/瓶,置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻48小时后取出,室温融解后一部分疫苗各取10 mL置离心管中,以3000 r/min离心15分钟,观察管底析出水相;另一部分疫苗再置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻48小时后取出融解,如此冻融3次后各取10 mL置离心管中,以3000 r/min离心15分钟,观察管底析出水相。

2.2 与含有不同比例硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次的稳定性检测

分别以 Tris-NaCl 和 GD0503 株为抗原与含有不同比例硬脂酸铝(0、1.0%、1.2%、2.0%)的白油佐剂以水油比1:2进行乳化。每组疫苗乳化后进行剂型和稳定性检测,合格后分装,10 mL/瓶,分别置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次后各取10 mL置离心管中,以3000 r/min离心15分钟,观察管底析出水相。

2.3 GD0503株不同抗原含量分别与白油佐剂乳化的疫苗 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次的稳定性检测

分别将灭活后的GD0503株抗原液用Tris-NaCl缓冲液依次调整至 6.5×10^9 CCU/mL、 1.3×10^9 CCU/mL、 6.5×10^8 CCU/mL,与含2.0%硬脂酸铝的白油佐剂进行乳化。每组疫苗乳化后进行剂型和稳定性检测,合格后分装,10 mL/瓶,每组疫苗分别取样置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融1次和冻融3次后各取10 mL置离心管中,以3000 r/min离心15分钟,观察管底析出水相。

2.4 不同种类疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测

将不同公司不同类型的10种油佐剂(疫苗的具体信息详见表1),以及猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)的参考疫苗分别置-70℃冻融1次后,各取10 mL,以3000 r/min离心15分钟,观察管底析出水相。

表1 不同公司油佐剂疫苗信息

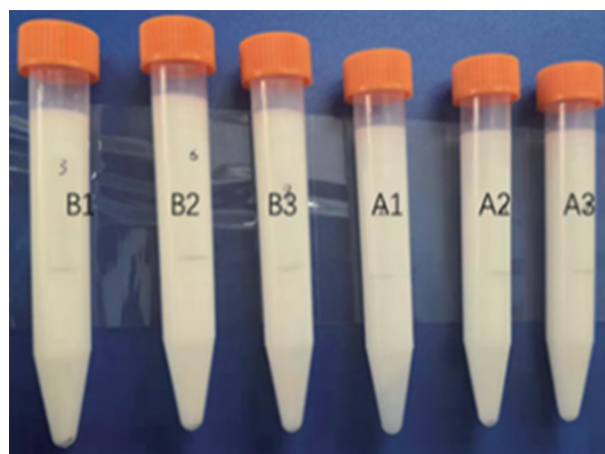
编号	通用名	厂家
1	猪伪狂犬病灭活疫苗	A
2	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H9亚型)、传染性法氏囊病四联灭活疫苗(La Sota株+M41株+YBF003株+S-VP2蛋白)	B
3	猪圆环病毒2型灭活疫苗(WH株)	C
4	猪细小病毒病灭活疫苗(YBF01株)	B
5	猪细小病毒病灭活疫苗(WH-1株)	C
6	鸡毒支原体灭活疫苗	D
7	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H9亚型)三联灭活疫苗(La Sota株+M41株+YBF003株)	B
8	猪圆环病毒2型灭活疫苗(WH株)	E
9	禽流感三价灭活疫苗	E
10	罗非鱼无乳链球菌灭活疫苗	E
16	猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)	E

3 结果

3.1 不同水油比乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次的稳定性检测结果

分别以Tris-NaCl和猪肺炎支原体(GD0503株)为抗原与白油佐剂以水油比1:1.5、1:2、1:3进行乳化。每组疫苗分别置-70℃冻融1次和冻融3次

后,取10 mL置离心管中,以3000 r/min离心15分钟,管底析出水相详见表2、图1和图2。



注:B1抗原为GD0503株,水油比1:1.5;B2抗原为GD0503株,水油比1:2;B3抗原为GD0503株,水油比1:3;A1抗原为Tris-NaCl,水油比1:1.5;A2抗原为Tris-NaCl,水油比1:1.2;A3抗原为Tris-NaCl,水油比1:3。图2同

图1 以不同水油比乳化的疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测结果

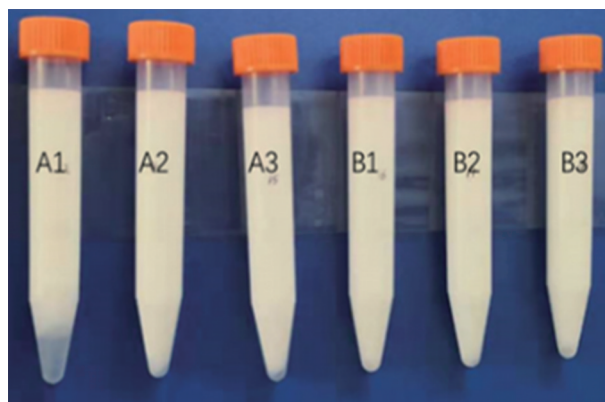


图2 以不同水油比乳化的疫苗-70℃冻融3次后稳定性检测结果

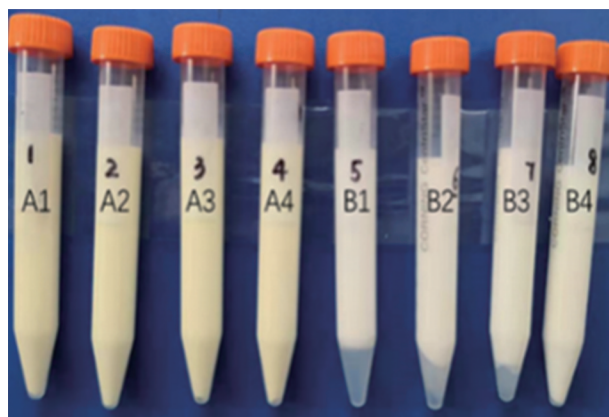
表2 不同水油比乳化的疫苗稳定性检测结果

名称	疫苗名称					
	Tris-NaCl			GD0503株		
水油体积比	1:1.5	1:2	1:3	1:1.5	1:2	1:3
疫苗编号	A1	A2	A3	B1	B2	B3
-70℃冻融1次后稳定性检测结果(10 mL)	管底析出水相约0.3 mL(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)
-70℃冻融3次后稳定性检测结果(10 mL)	管底析出水相约0.5 mL(疑似破乳)	管底析出水相约50 μL(不破乳)	管底析出水相约50 μL(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)

表2、图1和图2结果表明, GD0503株以不同的水油比1:1.5、1:2和1:3乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次管底均无水相析出; Tris-NaCl水油比1:1.5乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次离心管底析出水相依次约为0.3 mL和0.5 mL; Tris-NaCl水油比1:2和1:3乳化的疫苗-70℃冻融1次离心管底均未见水相析出, 冻融3次后离心管底均有水相析出, 约50 μL。

3.2 与含有不同比例硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次稳定性检测结果

分别以 Tris-NaCl 和猪肺炎支原体(GD0503株)为抗原, 与含有不同硬脂酸铝的白油佐剂以水油比1:2进行乳化, 每组疫苗置-70℃冻融1次和冻融3次后, 取10 mL置离心管中, 以3000 r/min离心15分钟, 管底析出水相详见表3、图3和图4。



注: A1 抗原为 GD0503 株, 0% 硬脂酸铝; A2 抗原为 GD0503 株, 1.0% 硬脂酸铝; A3 抗原为 GD0503 株, 1.2% 硬脂酸铝; A4 抗原为 GD0503 株, 2.0% 硬脂酸铝; B1 抗原为 Tris-NaCl, 0% 硬脂酸铝; B2 抗原为 Tris-NaCl, 1.0% 硬脂酸铝; B3 抗原为 Tris-NaCl, 1.2% 硬脂酸铝; B4 抗原为 Tris-NaCl, 2.0% 硬脂酸铝。图4同

图3 含不同硬脂酸铝乳化的疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测结果

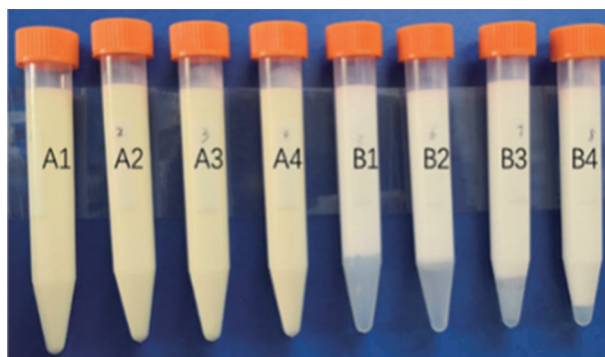


图4 含不同硬脂酸铝乳化的疫苗-70℃冻融3次后稳定性检测结果

表3、图3和图4结果表明, GD0503株与含有不同硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次离心管底均无水相析出, 即不破乳。Tris-NaCl与含0、1.0%、1.2%、2%的硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗冻融1次离心管底析出水相依次约为0.8 mL、0.5 mL、0.2 mL、0, 冻融3次离心管底析出水相依次约为1.2 mL、1.1 mL、0.5 mL、0.1 mL。

3.3 GD0503株不同抗原含量分别与白油佐剂乳化的疫苗-70℃冻融1次和冻融3次稳定性检测结果

GD0503株抗原液用 Tris-NaCl 依次调整至 6.5×10^9 CCU/mL、 1.3×10^9 CCU/mL、 6.5×10^8 CCU/mL, 分别与白油佐剂乳化。每组疫苗置-70℃冻融1次和冻融3次后, 取10 mL置离心管中, 以3000 r/min离心15分钟, 管底析出水相详见表4、图5和图6。

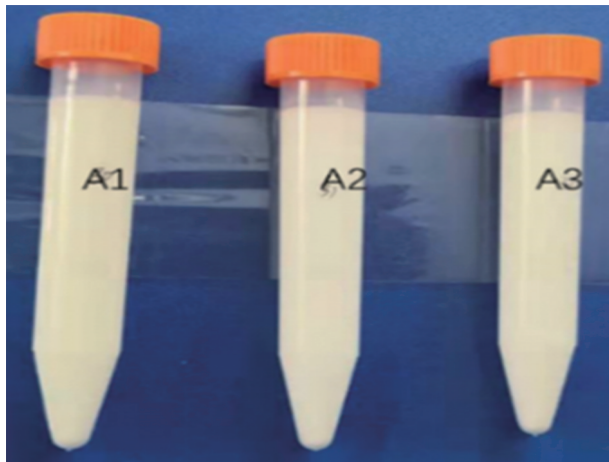
表4、图5和图6结果表明, GD0503株与白油佐剂乳化的疫苗 5×10^9 CCU/头份、 1×10^9 CCU/头、 5×10^8 CCU/头份-70℃冻融1次和冻融3次, 管底均未见水相析出。

表3 含不同比例硬脂酸铝的白油佐剂乳化的疫苗稳定性检测结果

名称	疫苗名称							
	Tris-NaCl				GD0503株			
硬脂酸铝	0%	1.00%	1.20%	2%	0%	1.00%	1.20%	2%
疫苗编号	B1	B2	B3	B4	A1	A2	A3	A4
-70℃冻融1次后稳定性检测结果(10mL)	破乳	破乳	疑似破乳	不破乳	不破乳	不破乳	不破乳	不破乳
-70℃冻融3次后稳定性检测结果(10mL)	破乳	破乳	破乳	不破乳	不破乳	不破乳	不破乳	不破乳

表4 不同抗原含量分别与白油佐剂乳化的疫苗稳定性检测结果

名称	疫苗名称		
含灭活前抗原含量(CCU/mL)	6.5×10 ⁹	1.3×10 ⁹	6.5×10 ⁸
每头份疫苗含量(2mL)	5×10 ⁹	1×10 ⁹	5×10 ⁸
疫苗编号	A1	A2	A3
-70℃冻融1次后稳定性检测结果(10mL)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)
-70℃冻融3次后稳定性检测结果(10mL)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)	管底未见水相析出(不破乳)



注: A1: 5×10⁹ CCU/头份; A2: 1×10⁹ CCU/头份; A3: 5×10⁸ CCU/头份。图6同

图5 MHP不同抗原含量乳化的疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测结果

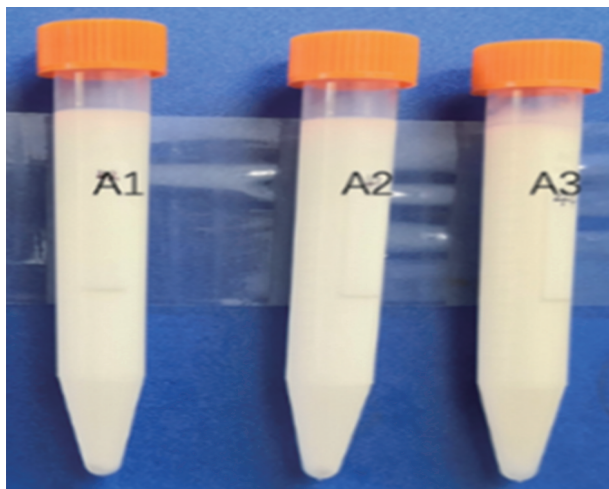
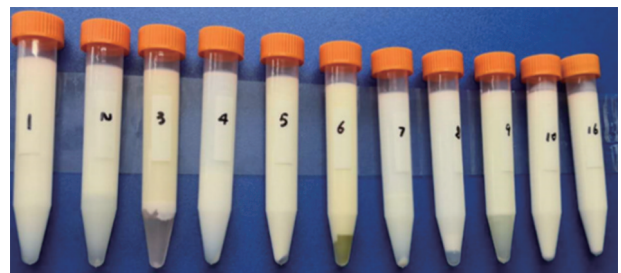


图6 MHP不同抗原含量乳化的疫苗-70℃冻融3次后稳定性检测结果

3.4 不同种类疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测结果

将不同公司不同种类的10油佐剂疫苗,以及猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)的参考疫苗-70℃冻融1次后,以3000 r/min离心15分钟,管底析出水相情况见图7。

图7结果表明,不同公司不同种类的10种油佐剂疫苗-70℃冻融1次,有7种疫苗会发生破乳现象,但是也有3种疫苗和我们的猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)(编号16)性状保持不变,如C公司的细小病毒苗(编号5)、E公司的圆环病毒苗(编号8)和罗非鱼无乳链球菌苗(编号10)。



注: 1:猪伪狂犬病灭活疫苗; 2:禽四联灭活疫苗(La Sota株+M41株+YBF003株+S-VP2蛋白); 3:猪圆环病毒2型灭活疫苗(WH株); 4:猪细小病毒灭活疫苗(YBF01株); 5:猪细小病毒灭活疫苗(WH-1株); 6:鸡毒支原体灭活疫苗; 7:禽三联灭活疫苗(La Sota株+M41株+YBF003株+S-VP2蛋白); 8:猪圆环病毒2型灭活疫苗(WH株); 9:禽流感三价灭活疫苗; 10:罗非鱼无乳链球菌灭活疫苗; 16:猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)

图7 不同公司不同种类疫苗-70℃冻融1次后稳定性检测结果

4 讨论

从GD0503株乳化的各种疫苗-70℃冻融后的稳定性检测结果可知, GD0503株乳化的疫苗稳定性比较好,受乳化的水油比、白油佐剂中硬脂酸铝的含量等因素的影响较小, -70℃冻融1次和冻融3次性状均不发生改变。可能原因一方面是抗原含量在合理范围内(每头份疫苗含灭活前抗原在1.0×10⁷ CCU~5×10¹⁰ CCU内),以前的经验告诉我们抗原含量过低(每头份疫苗含灭活前抗原小于1.0×10⁵ CCU)或过高(每头份疫苗

含灭活前抗原大于 1.0×10^{11} CCU)都会影响疫苗的稳定性;另一方面可能是水相的 pH 值(7.2~7.4),乳化的水油比、表面活性剂的量、乳化速率、乳化时间及乳化温度都在合理的范围内,使疫苗中的液珠大小适中且均匀,相对稳定^[3];若脱离这些范围,猪支原体肺炎灭活疫苗(GD0503株)的稳定性也会发生改变。

从 Tris-NaCl 乳化的各种疫苗-70℃的稳定性检测结果可知,疫苗的稳定性与乳化时的水油比、白油佐剂中硬脂酸铝的含量、冻融次数有关,油相占比越大、含硬脂酸铝越高的疫苗在-70℃冻融后就越稳定;同时也可能与乳化时疫苗的抗原类型和乳化工艺有关,例如抗原颗粒的大小与疫苗稳定性可能成反比,乳化时的均一性、剪切机的转速和乳化时间、温度等也与疫苗的稳定性密切相关^[4]。不同公司不同种类的10种油佐剂疫苗有7种发生破乳现象可能受乳化时表面活性剂的量、水油比、白油佐剂中硬脂酸铝的含量、乳化的强度和ación、制备油乳剂的方式等因素的影响。一般地,Span-80与Tween-80最佳浓度组成的混合表面活性剂使膜的强度增加,表面张力降至极低值且不易破裂,因此液珠不易聚结,油乳剂更稳定,偏离最佳浓度都会影响油乳剂的稳定性^[5]。水油比1:1、1:2要比1:3乳化的疫苗稳定性差;白油佐剂中含硬脂酸铝的含量偏低,如含0、1.0%、1.2%的硬脂酸铝的白油佐剂要比含2%乳化的疫苗稳定性差;分散相在强大机械力的作用下分散越来越均匀,故形成的油乳剂颗粒越均匀细密^[6],油乳剂就越稳定。但当乳化强度达到一定程度后继续增大强度,油乳剂的稳定性提高较小,颗粒之间碰撞较多,容易破乳;制备油乳剂的方式有两种,一种是水相加入油相中,另一种是油相加入水相中,两种不同的制备方式对油乳剂的稳定性影响

很大^[7]。

基于动物福利的呼声越来越高,替代方法已是国内外兽用生物制品效力检验的流行趋势^[1]。参考疫苗作为对照品,稳定而长久的保存是关键^[8]。不同种类疫苗-70℃冻融后大部分发生破乳,但也有不破乳,说明灭活疫苗经过冻结后也可能不发生性状改变,再结合我们对参考疫苗-70℃冻融后的免疫原性试验结果(疫苗的保护力与冻融前无明显差异),我们有理由认为,油佐剂的参考疫苗作为标准物质,在冻融后性状不变的情况下是可以放入-70℃保存的。

参考文献

- [1] 彭伍平,王延辉,胡东波,等.猪圆环病毒2型灭活疫苗效力检验中参考疫苗的应用[J].中国兽药杂志,2011,34(92):9-12.
- [2] 宋海岩,付春杰,石莹,等.重组禽流感病毒灭活疫苗(细胞源)破乳方法对比及应用[J].吉林畜牧兽医,2018,1:17-19.
- [3] 刘华杰.影响油乳剂乳液疫苗稳定性的因素及其评价方法[J].家禽科学,2017(03):52-55.
- [4] 江兴华.不同乳化工艺对猪圆环病毒2型灭活疫苗稳定性的影响[J].福建农业学报,2018,33(06):556-560.
- [5] OPAWALE F O, BURGESS D J. Influence of interfacial properties of lipophilic surfactants on water-in-oil emulsion stability[J]. Journal of colloid and interface science, 1998, 197(1): 142-150.
- [6] JANSEN T, HOFMANS M P M, THEELEN M J G, et al. Structure-activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses[J]. Vaccine, 2005, 23(8): 1053-1060.
- [7] 杨瑛.影响油乳剂疫苗稳定性因素的探讨[J].畜牧兽医杂志,1995,14(1):15-17.
- [8] 全浩,韩永志.标准物质及其应用技术[M].北京:中国化工出版社,2003:38.

高效液相色谱法测定癸氧喹酯溶液含量

曾海波, 陈创华

(广东省农产品质量安全中心, 广东 广州 510230)

摘要:采用高效液相色谱法测定癸氧喹酯溶液的含量, 在2~250 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, 峰面积的常用对数与进样量浓度的常用对数呈良好的线性关系, $R^2=1$ ($n=5$), 平均回收率为99.04%~99.87%, RSD在0.22%~0.71%之间。此方法分析时间短, 样品前处理简便, 定量结果准确, 重现性好, 结果令人满意, 为癸氧喹酯溶液的质量控制提供了依据。

关键词:癸氧喹酯; 溶液; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号:S852.7 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)04-0047-04

癸氧喹酯是一种非常有效的喹诺酮类畜禽用抗球虫药。在球虫的无性繁殖阶段孢子进入肠粘膜上皮细胞后, 通过干扰球虫DNA合成而阻止其发育, 从而避免家禽肠道受到损害。其主要用于预防鸡的变位、柔嫩、巨型、堆型、毒害和布氏艾美耳球虫引起的球虫病。目前癸氧喹酯溶液含量测定方法的依据为农业部批准的第1234号(3%)和1335号(2.25%)两个公告^[1], 两个质量标准均各有差异, 难以形成统一、稳定、简便、快捷的测试方法。本文拟采用《中国兽药典》^[2]癸氧喹酯预混剂中含量测定方法, 建立癸氧喹酯溶液含量的测定方法, 为该制剂的质量控制提供依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 Agilent 1100; 甲醇(AR)、水(超纯水)、冰醋酸(AR); 规格为3%的癸氧喹酯溶液样品分别由山东富利特药业有限公司、安徽华澳生物技术有限公司、安徽科尔药业有限公司提供, 规格为2.25%的癸氧喹酯溶液样品分别由济南亿民动物药业有限公司、广东燕唐药业有限公司提供, 空白溶剂由广东燕唐药业有限公司提供; 癸氧喹酯标准品从中国兽医药品监察所采购, 批号为K0651211, 含量为99.7%。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

流动相为甲醇-水-冰醋酸(85:15:1); 色谱柱为Waters XSelect®CSHTM-C18 4.6×150 mm, 5 μm ; 检测波长为265 nm; 进样量为10 μl ; 流速为每分钟1.0 ml。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

取癸氧喹酯对照品适量, 精密称定, 置100 ml量瓶中, 加氯化钙甲醇溶液(取氯化钙1 g, 加甲醇100 ml, 超声使溶解)适量, 超声15分钟, 放冷; 用氯化钙甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀; 滤过, 精密量取续滤液5 ml, 置50 ml量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。

2.2.2 供试品溶液的制备

取适量癸氧喹酯溶液(约相当于癸氧喹酯50 mg), 精密量取, 置100 ml量瓶中, 加入氯化钙甲醇溶液适量, 超声15分钟, 放冷, 用氯化钙甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀; 滤过, 精密量取续滤液5 ml, 置50 ml量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。

2.3 系统适用性试验

取50 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液, 按2.1项下的色谱

条件进样。理论板数按癸氧喹酯峰计算为4904, 分离度为2.4。(见图1)

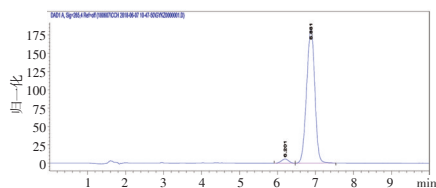


图1 系统适用性试验图

2.4 线性关系

取每1 ml中含癸氧喹酯2、10、50、100、250 μg的对照品溶液,按2.1项下的色谱条件进样,记录色谱图,以对照品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算线性回归方程。结果表明,在2~250 μg/ml范围内,峰面积的常用对数与进样量浓度的常用对数呈良好的线性关系,标准曲线如下图,回归方程 $Y=63.821X+6.5379$ $R^2=1$ ($n=5$)。(见图2)

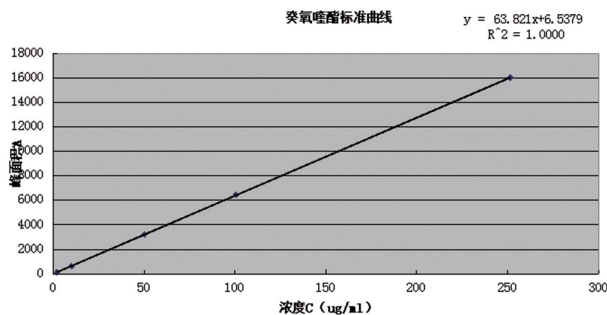


图2 癸氧喹酯标准曲线

2.5 检测限及定量限

按信噪比 $S/N=3$ 时,癸氧喹酯的检测限为0.5 μg/ml;按信噪比 $S/N=10$ 时,癸氧喹酯的定量限为2.0 μg/ml。

2.6 精密度试验

取广东燕塘厂家的样品6份,每份精密量取1 ml,分别置100 ml量瓶中,加入适量氯化钙甲醇溶液,超声15分钟,放冷,用氯化钙甲醇溶液稀释至刻度,摇匀;滤过,精密量取续滤液5 ml,置50 ml量瓶中,再分别加入癸氧喹酯对照品(0.2536 mg/ml)各5 ml,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按2.1项下的色谱条件进样,连续进样6针,测定峰面积。相对标准

偏差RSD为0.48%,结果表明本法的精密度良好。(见表1)

表1 精密度试验检测结果表

峰面积	平均值	相对标准偏差(RSD)(%)
2565	2578	0.48
2568		
2569		
2588		
2586		
2594		

2.7 回收率试验

取已知含量的癸氧喹酯原料40、50、60、72 mg,按含量规格的80%、100%、120%、144%,模拟制成含癸氧喹酯原料约2%、2.5%、3%、3.6%浓度的样品各4批,共12批样品,按2.1项下的色谱条件进样,测定峰面积。结果表明回收率在99.04~99.87%,批间RSD在0.22~0.71%之间, $n=3$ 。(见表2)

表2 癸氧喹酯回收率试验检测结果表

	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差(RSD)(%)
制剂标示	100.53		
量的80%	99.11	99.78	0.71
添加量	99.71		
制剂标示	99.09		
量的100%	99.24	99.35	0.26
添加量	99.21		
制剂标示	99.67		
量的120%	100.41	99.87	0.53
添加量	99.39		
制剂标示	99.29		
量的144%	98.8	99.04	0.22
添加量	98.77		

2.8 耐用性

取癸氧喹酯对照品溶液,在不同柱温、流速、不同的流动相比例,不同色谱柱及不同的高效液相色谱仪进行测定。

2.8.1 不同柱温

采用安捷伦色谱仪1200,以Waters XSelect®RCSHTM-C18(4.6×150 mm,5 μm)为色谱柱,

流速为 1.0 ml/min, 设定不同柱温对色谱峰的影响。结果显示, 不同柱温对主峰影响不大。(见表 3)

表 3 不同柱温试验检测结果表

柱温(°C)	主峰保留时间(min)	塔板数	对称因子
25	10.032	7070	0.97
30	9.554	7360	0.96
35	9.303	6554	0.96

2.8.2 不同流速

采用安捷伦色谱仪 1200, 以 Waters XSelect®CSHTM-C18 (4.6×150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 柱温为 25 °C, 设定不同流速对色谱峰的影响。结果显示, 流速大于 1.0 ml/min 的主峰出峰时间明显比流速 0.8 ml/min 缩短, 但柱效都能满足检测需求。(见表 4)

表 4 不同流速试验检测结果表

流速(ml/min)	主峰保留时间(min)	塔板数	对称因子
0.8	16.489	7911	0.98
1	10.218	6257	0.97
1.2	10.314	6492	0.97

2.8.3 不同流动相比

采用安捷伦色谱仪 1200, 以 Waters XSelect®CSHTM-C18 (4.6×150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 柱温为 25 °C 及流速为 1.0 ml/min, 设定不同流动相比对色谱峰的影响。结果显示, 随着甲醇的比例增加, 主峰的出峰时间明显缩短, 理论塔板数明显下降。(见表 5)

表 5 不同流动相比试验检测结果表

流动相比	主峰保留时间(min)	塔板数	对称因子
甲醇-水-冰醋酸(83:17:1)	9.033	3967	1.19
甲醇-水-冰醋酸(85:15:1)	7.325	3389	1.14
甲醇-水-冰醋酸(87:13:1)	5.901	2795	1.06

2.8.4 不同机型及色谱柱

设柱温为 25 °C 及流速为 1.0 ml/min, 采用不同机型及色谱柱对色谱峰的影响。结果显示, 不同的色谱柱及机型均能满足检测需求。(见表 6)

表 6 不同机型及色谱柱试验检测结果表

机型	色谱柱	主峰保留时间(min)
安捷伦色谱仪 1200	WatersXSelect®CSHTM-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)	11.297
安捷伦色谱仪 1200	WatersXBridge®C18 (4.6×250 mm, 5 μm)	24.212
高效液相色谱仪 waters-2695	WatersXBridge®C18 (4.6×250 mm, 5 μm)	9.532

2.9 专属性

取溶剂、厂家提供配方辅料作为基质各适量, 精密量取氯化钙甲醇溶液 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为溶剂; 取 a-吡咯烷酮、二甲基亚砜, 聚乙二醇 400、氯化镁、无水乙醇、吐温-80 按广东燕塘药业公司的配方配制成 100 ml, 精密量取 2 ml, 置 100 ml 量瓶中, 用氯化钙甲醇溶液稀释至刻度, 精密量取 5 ml, 置 50 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为辅料; 按上述方法测定, 在癸氧喹酯相应的保留时间附近均无吸收, 结果表明, 溶剂和辅料对主成分均无干扰(见图 3、4、5)。

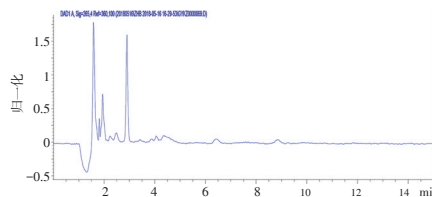


图 3 溶剂峰图

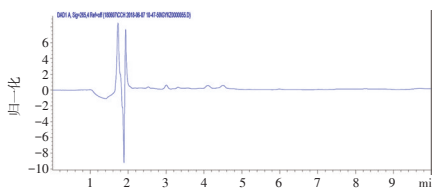


图 4 辅料峰图

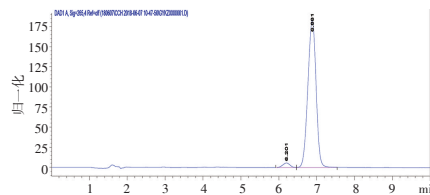


图 5 癸氧喹酯对照品图

2.10 稳定性试验

取对照品溶液,按2.1项下的色谱条件进样,测定峰面积,分别在0、2、4、8、24、48小时进样,考察其稳定性。结果显示,在48小时内主峰面积RSD仍小于2.0%,该溶液在室温放置48小时内稳定。(见表7)

表7 稳定性试验检测结果表

放置时间(h)	0	2	4	8	24	48	平均值	RSD (%)
峰面积	3069	3065	3064	3060	3027	3123	3068	1

2.11 样品含量测定

取癸氧喹酯溶液15批次,分别各进行2次平行测定,按2.1项下的色谱条件进样,测定峰面积,以外标法计算癸氧喹酯的标示含量。同时,将癸氧喹酯溶液3%和2.25%分别用农业部公告第1234号、1335号测定;经检验,两种规格,15批样品用两种方法的结果相差不大。(见表8)

3 小结

癸氧喹酯溶液标准分别收载于农业部公告第1234号(3%)、1335号(2.25%)两个公告中,含量测定的流动相均需采用三乙胺调节pH值,调节pH后,每1000 ml再加入1.0 g氯化镁(农业部公告第1234号),或者每1000 ml再加入1.0 g硝酸钙1.0 g(农业部公告第1335号),操作过程复杂繁琐;而且规格为3%的癸氧喹酯溶液标准的含量测定方法用氯化镁二氯甲烷/无水甲醇溶液溶解,使用了二氯甲烷对人体毒性较大的试剂。本研究流动相配制简单方便,无需调节pH值,并且检测灵敏度高,

表8 含量测定各方法试验检测结果表

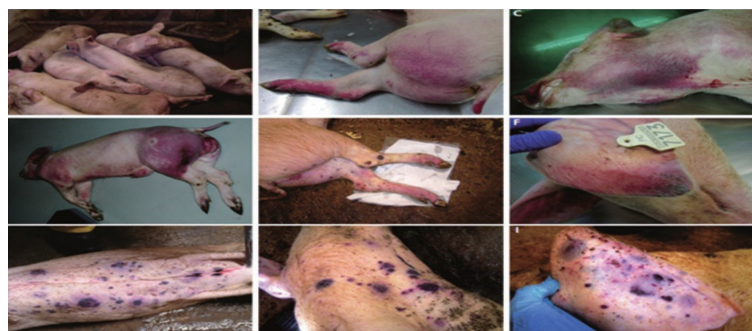
生产企业	新方法		农业部公告第1234号		农业部公告第1335号	
	平均值 (%)	相对偏差 (%)	平均值 (%)	相对偏差 (%)	平均值 (%)	相对偏差 (%)
山东富利特药业有限公司	86.31	0.03	85.36	0.02	/	
	85.87	0.35	87.35	0.06		
	85.69	0.41	86.82	0.21		
安徽华澳生物技术有限公司	95.7	0.3	97.46	0.52		
	96.87	0.43	97.53	0.33	/	
	97.58	0.32	98.22	0.77		
安徽科尔药业有限公司	93.87	0.39	95.67	0.02		
	94.29	1.12	95.14	0.49	/	
	94.49	0.77	97.64	0.22		
济南亿民动物药业有限公司	96.68	0.14			96.75	0.1
	97.28	0.3	/		95.09	0.29
	96.83	0.21			95.41	0.21
广东燕唐药业有限公司	95.38	0.28			95.38	0.05
	94.53	0.09	/		96.51	0.12
	101.56	0.09			102.18	0.05

与癸氧喹酯预混剂标准的含量测定方法一致,能同时用于癸氧喹酯溶液及预混剂的含量测定。

通过本法改良测定癸氧喹酯溶液的含量,灵敏度、稳定性高,且干扰少,回收率高,结果准确,方法可靠,可为癸氧喹酯溶液的质量控制提供依据。

参考文献:

- [1] 农业部兽药评审中心.《兽药质量标准汇编》(2006-2011年)[S].北京:中国农业出版社,2013.4.
- [2] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典》2015年版一部[S].北京:中国农业出版社,2015.12.



黎金荣等 图2 急性非洲猪瘟临床表现



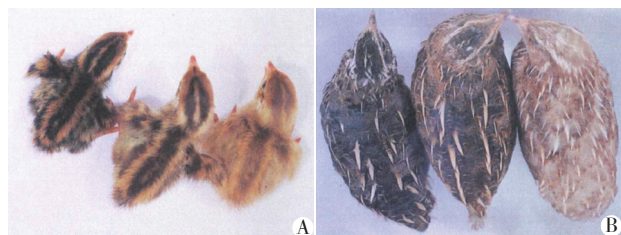
黎金荣等 图3 非洲猪瘟病理变化



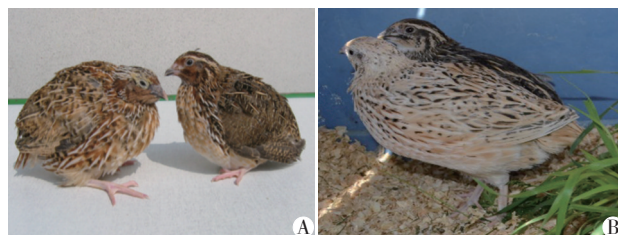
何艺平等 图1 野生型日本鹌鹑 ($AL*N$), 浅黄褐色 (cinnamon, $AL*C$), 和性连锁不完全白化 (sex-linked imperfect albinism, $AL*A$) 表型^[3]



注: 纯合子表型表现为纯白色, 杂合子个体表型显示为灰色羽^[5]
何艺平等 图2 银色羽色突变纯合子 (B/B) 和杂合子个体表型 ($B/+$)



何艺平等 图3 野生型 (A左、B左)、褐色 (A中、B中) 和红棕色 (A右、B右)^[6]



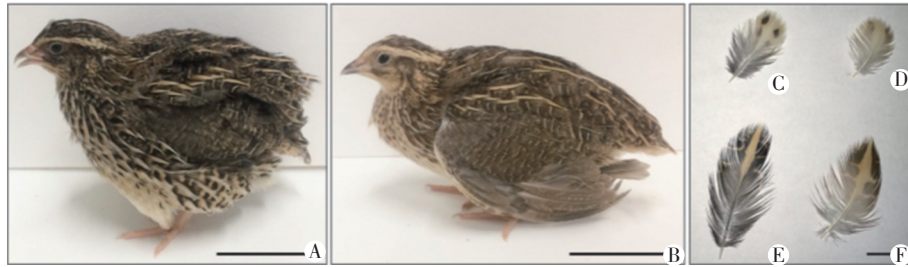
何艺平等 图4 黄色羽鹌鹑 ($Y/Y+$, A左) 和野生型羽色日本鹌鹑 ($Y+/Y+$, A右)、B图为 *fawn2* 突变体成年鹌鹑 (*beige/beige*)^[10, 11]



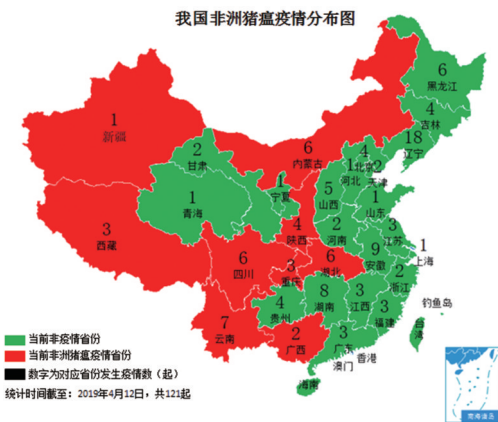
何艺平等 图5 隐性黑色个体成年鹌鹑胸部和背部羽毛展示^[12]



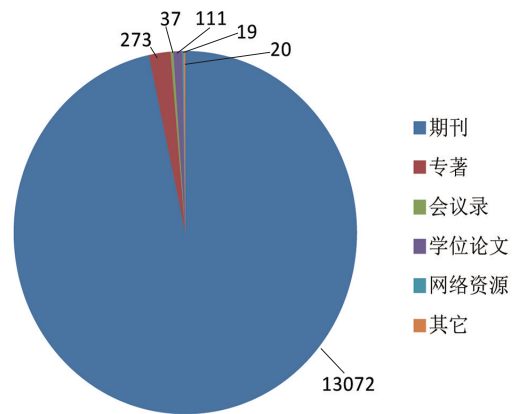
何艺平等 图6 野生型 (左) 和薰衣草个体 (右)^[13]



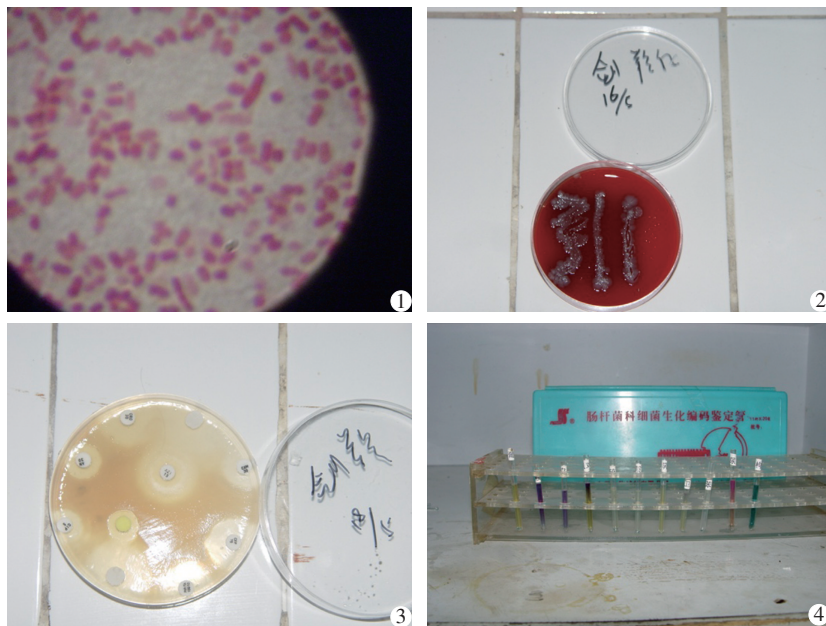
何艺平等 图8 野生型羽色(A)和yw个体(B)以及yw(C,D)和野生型(E,F)个体胸部背部羽毛^[15]



黎金荣等 图1 2018年8月-2019年4月我国ASF疫情分布



张琴等 图1 预防兽医学专业博士论文引文类型分布



张天佑等 图1 血液培养基中细菌菌落形态 图2 菌落镜检为多种G-杆菌(1000倍)
图3 生化试验 图4 药敏试验