

罗行炜,孙华润,魏单单,等.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌分离鉴定及*floR*基因检测[J].江苏农业科学,2019,47(21):228-232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.055

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌分离鉴定及*floR*基因检测

罗行炜¹,孙华润¹,魏单单¹,朱莹莹¹,徐引弟²,贺丹丹¹,刘建华¹,潘玉善¹,吴华¹,苑丽¹,胡功政¹

(1.河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002; 2.河南省农业科学院畜牧兽医研究所,河南郑州 450002)

摘要:为探究猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(APP)临床分离株对氟苯尼考(FFC)的耐药性及*floR*基因的流行与分布情况,收集河南、湖北、江西、陕西、湖南、山西、安徽等7个省份合作猪场送检的病死猪肺脏、脾脏、支气管黏液等206份病料样本,从中分离APP并鉴定,采用微量肉汤稀释法测定分离菌株对FFC的敏感性,PCR及测序方法检测*floR*基因,并用随机引物PCR(AP-PCR)方法分析临床分离菌株之间的同源性。结果表明,成功分离鉴定了APP 28株,分离率为13.59%。4株APP对FFC耐药,耐药率为14.29%;15株携带*floR*基因,*floR*检出率为53.57%,高于APP对FFC的耐药率;有11株分离菌*floR*阳性但对FFC并不耐药。分析RAPD系统树状图发现,28株APP被分为几乎无核苷酸同源性的A和B 2大类,25种RAPD型,其中A类25株,分22种RAPD型,14株携带*floR*基因,这些菌株间的核苷酸同源性为40%~80%;B类3株,分3种RAPD型,1株携带*floR*基因。本研究提示APP的*floR*基因主要以水平方式传播。

关键词:猪传染性胸膜肺炎放线杆菌;PCR;耐药性;*floR*基因;随机扩增多态性DNA(RAPD)

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)21-0228-04

猪传染性胸膜肺炎是一种高度特异性传染性猪呼吸道类疾病,在我国集约化养殖场尤为多见,引起该病发生的病原为猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(APP)。我国自1987年首次发现此病例以来,某些地区已成功分离鉴定出病原菌APP^[2-5],如锦州地区^[2]、江苏泰兴^[3]、湖北^[4]、贵州^[5]等。近年,APP临床分离株的耐药现象越来越严重,其中APP对氟苯尼考(FFC)的耐药性也已受到国内外专家学者的关注^[5-11]。FFC作为动物专用的酰胺醇类广谱抗生素,对APP的最小抑菌浓度为0.20~1.56 μg/mL,主要用于巴氏杆菌引起的牛呼吸道感染、猪传染性胸膜肺炎、鸡大肠杆菌病等^[6]。细菌对FFC等酰胺醇类药物耐药的机理之一在于*floR*基因的介导,即*floR*基因编码耐FFC或氯霉素的外排泵蛋白,从而导致这类药物很难进入或不能进入细菌体内发挥作用^[12]。

由于菌株分离时间及分离地点的不同,导致不同地域或不同季节的APP分离株对FFC的耐药情况呈现较大差异。本研究对来自河南(焦作、中牟、安阳等)、湖北、江西、陕西、湖南、山西、安徽等7个省份疑似病猪的肺脏、脾脏、支气管等病变组织进行目的菌分离鉴定,测定APP分离株对FFC的敏感性,进一步检测其*floR*基因的携带情况,并运用随机引物PCR(AP-PCR)技术检测APP的随机扩增多态性DNA(RAPD)图谱,根据聚类结果分析分离株的同源性,为集约化养猪场合理使用FFC及进一步研究APP分离株*floR*基因的传播机制提供理论依据。

收稿日期:2018-08-09

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0501304)。

作者简介:罗行炜(1993—),男,河南光山人,硕士研究生,主要从事细菌耐药机制研究。E-mail:1272376863@qq.com。

通信作者:胡功政,教授,博士生导师,主要从事细菌耐药机制研究。E-mail:yaolilab@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料的采集 病料主要来自河南(焦作、中牟、安阳等)、湖北、江西、陕西、湖南、山西、安徽等7个省份地区养猪场的患病猪,取病变的肺脏、脾脏、支气管等组织样品,共206份。

1.1.2 标准菌株 APP标准菌株(ATCC27090),购自中国普通微生物菌种保存中心。

1.1.3 培养基及相关试剂 培养基:胰蛋白大豆营养琼脂(TSA)、胰蛋白大豆肉汤(TSB)、巧克力色血琼脂平板,均购自北京奥博星生物技术有限公司。其中,TSA和TSB均分别加0.01% NAD和5%血清。

新生小牛血清,购自北京索莱宝生物科技有限公司。

相关试剂:2×*Taq* PCR Master Mix、ddH₂O、DSTM2000 DNA Marker,均购自康为世纪(北京)生物科技有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、50×TAE、1×TE(pH值=8.0),均购自北京索莱宝生物科技有限公司。

各种生化鉴定管(试剂),购自山东青岛海博生物技术有限公司。

1.1.4 引物设计与合成 APP的所有血清型中都存在*Apx IV*基因,在GenBank上下载*Apx IV*基因片段序列(登录号:AF021919.1),设计并合成*Apx IV*扩增引物;*floR*引物参照Bossé等的试验^[8];AP-PCR的引物参照Lee等的试验^[13],引物序列见表1,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.5 药物 氟苯尼考原料(英文简称:FFC;含量:95%),由河南牧翔动物药业有限公司提供,有效期内进行使用。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离与镜检 在无菌超净操作台中,分别从猪的肺脏、脾脏、支气管等病料组织中取样,划线接种于巧克力

表 1 引物序列

基因	引物名称	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)	参考文献
<i>ApxIV</i>	<i>ApxIV</i> - F	TGGCACTGACGGTGATGAT	442	[1]
	<i>ApxIV</i> - R	GGCCATCGACTCAACCAT		
<i>floR</i>	<i>floR</i> - F	CGACGCCCGCTATGATCCAATCTC	510	[8]
	<i>floR</i> - R	CCCAAAAAGCCGGACTCGCGAAG		
<i>AP</i>	<i>AP</i> - F	GAGGGTGGCGGTTCT	可变	[13]

色血琼脂平板和 TSA 平板,37 ℃ 恒温培养 20 h。观察细菌的菌落形态,挑取疑似 APP 菌落接种于 TSB 中。经多次接种纯化培养,将已分离纯化的菌株进行革兰染色,在油镜下观察并记录菌体的形态特征。

1.2.2 分离菌株的生化试验鉴定 将纯化后的细菌纯培养物接种于含 0.01% NAD 和 5% 血清的生化鉴定管中,然后置于 37 ℃、10% CO₂ 培养箱中培养 24 h,观察并记录生化反应结果。

1.2.3 分离菌株的 PCR 鉴定 挑取纯化后的单菌落,于 TSB 中接种,气浴恒温摇床进行 37 ℃ 培养 20 ~ 24 h 后,菌液 PCR 鉴定。PCR 反应体系:2 × PCR *Taq* Master Mix 12.5 μL, *ApxIV* 上、下游引物各 1.0 μL,模板 DNA 3.0 μL, ddH₂O 7.5 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 56.5 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。分别以 TSB 和标准菌株 ATCC 27090 为阴性或阳性对照。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,阳性 PCR 产物回收,送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 进行比对。

1.2.4 药物储备液配制 采用分析天平精确称取适量 FFC,再采用高压后的去离子水(适量添加助溶剂 *N,N* 二甲基亚酰胺及乙醇)配制初始浓度为 5 120 μg/mL 的储备母液,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.5 药敏试验 参照临床与实验室标准协会(CLSI)执行标准,采用微量肉汤稀释法测定 FFC 对分离菌株的最小抑菌浓度(MIC)^[14],按照 CLSI 标准判读并计算 MIC₅₀、MIC₉₀ 和耐药率。以标准菌株 ATCC 27090 为质控菌。

1.2.6 细菌基因组 DNA 的制备 将 APP 菌株接种于 TSB 中,37 ℃ 培养 10 ~ 12 h,离心收集菌体后用 300 μL 1 × TE (pH 值 = 8.0) 缓冲液重悬菌体,煮沸 10 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,上清即为细菌基因组,用 1.5 mL Eppendorf 管收集,-20 ℃ 储存。

1.2.7 *floR* 基因检测 以 APP 分离株基因组 DNA 为模板,设计相关引物(表 1)进行 PCR 检测,反应体系:2 × PCR *Taq* Master Mix 10 μL,*floR* 基因上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 6 μL,菌株 DNA 2 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,63.5 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min;4 ℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳后,阳性 PCR 产物回收并送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对。

1.2.8 随机引物 PCR(AP-PCR) APP 分离株的 RAPD 图谱是运用 AP-PCR 技术确定的,以提取 DNA 作为模板,设计引物 AP 进行 PCR 扩增。AP-PCR 的反应体系:2 × PCR *Taq* Master Mix 10 μL,引物 1 μL,菌株 DNA 2 μL, ddH₂O 补至

20 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 40 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min;4 ℃ 保存。扩增产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,并用生物电泳凝胶成像系统生成电泳图后,再用 GelCompar II 6.6 软件对此随机引物扩增出的各菌株 DNA 条带进行整合,建立系统进化树状图。根据聚类结果,以 APP 的相似性系数进行分型,大于 80% 的判定为同一种 RAPD 型,小于 80% 的判定为不同的型^[15],见表 1。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离鉴定

2.1.1 分离菌株的培养特性 分离菌株经 37 ℃ 恒温箱中培养 18 ~ 20 h 后,在巧克力色血琼脂平板上菌落为浊白色、圆形隆起,直径大小为 1 ~ 2 mm,在 TSA 平板上菌落半透明、表面光滑、边缘整齐,菌落直径在 1 mm 左右(图 1),普通琼脂培养基上不生长。



图 1 TSA 平板的菌落形态

挑取典型菌落进行革兰染色镜检,油镜下可见革兰阴性小球杆菌,菌体较小,多散在杆状,符合 APP 的形态和染色特征(图 2)。

2.1.2 分离菌株的生化试验鉴定结果 生化试验鉴定结果显示,分离菌株均可发酵葡萄糖、蔗糖和甘露糖,但不发酵乳糖、阿拉伯糖、甘露醇和麦芽糖。尿酶试验和过氧化氢试验呈阳性,吲哚试验和硫化氢试验呈阴性。生化试验结果与文献上报道的 APP 分离株生化试验结果相吻合。

2.1.3 分离菌株的 PCR 鉴定结果 采用 *ApxIV* 毒素基因的特异性引物对分离菌株和标准菌株进行 PCR 扩增,均获得预期长度(442 bp)的特异性条带(图 3),测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,与 *ApxIV* 毒素基因(GenBank 登录号 AX002405)的同源率达到 99% 以上。

2.2 药敏试验结果

参照 CLSI 判定标准^[14],FFC 对 APP 的折点为 $S \leq 2$; $I =$

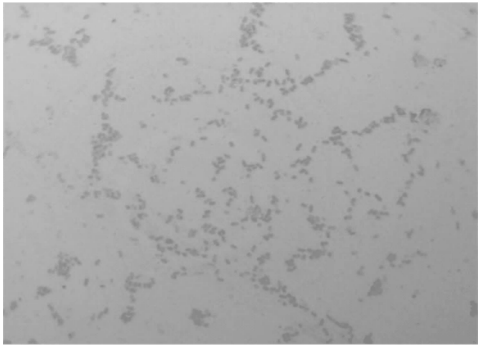
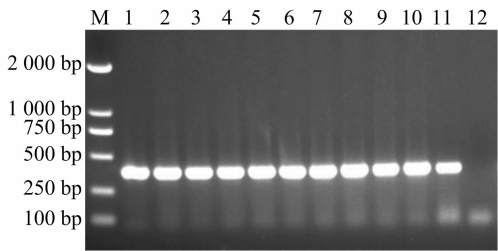


图2 显微镜下分离株的菌体形态(1 000×)

4;R≥8(S 表示敏感;I 表示中介;R 表示耐药)。FFC 质控 APP 的允许范围为 0.25 ~ 1.00 μg/mL,本次制备的药物储备



M—DM 2 000 DNA marker; 1~10—阳性菌株特异性条带; 11—阳性对照; 12—阴性对照

图3 APP 菌株的 PCR 扩增结果

液测试质控菌 ATCC27090 的 MIC <0.5 μg/mL,均符合要求。由表 2 可知,4 株 APP 对 FFC 耐药,耐药率为 14.29% (4/28), MIC 范围介于≤0.5 ~256.0 μg/mL。

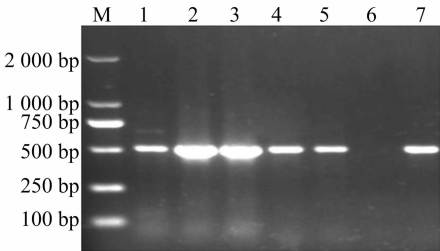
表 2 药敏结果

抗生素	不同 MIC 值的 APP 分离株株数(株)												MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药率
	≤0.5 μg/mL	1 μg/mL	2 μg/mL	4 μg/mL	8 μg/mL	16 μg/mL	32 μg/mL	64 μg/mL	128 μg/mL	256 μg/mL	512 μg/mL	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	
FFC	18	5	1	0	1	0	0	1	2	1	0	0.5	128	16	

注:表中“1”为药敏折点。

2.3 *floR* 基因检测结果

分离鉴定的 28 株 APP 有 15 株携带 *floR* 基因,检出率为 53.57% (15/28)。由图 4 可知,目的条带位于 510 bp 处,回收目的条带测序并进行 BLAST 比对,结果发现与 GenBank 已上传的大肠杆菌 *floR* 基因(GenBank 登录号:EF429662)同源性高达 99%。将 *floR* 基因的测序结果整理后上传到 GenBank,取得的 GenBank 序列号为 MG920811。



M—DM 2 000 DNA marker; 1~5—*floR* 基因阳性条带; 6—阴性对照; 7—阳性对照

图4 APP 分离株的 *floR* 基因检测结果

2.4 随机扩增多态性 DNA(RAPD)

AP—PCR 研究发现,28 株 APP 共被分成 A 和 B 2 大类,由图 5 可见,2 类间几乎不存在同源性。来自河南、湖北、江西、陕西、湖南、山西、安徽等 7 个省份的分离株核苷酸亲缘差异性跨度较大,大部分菌株间的同源性为 40% ~ 80%,表明此大多数 APP 分离株是不同的 RAPD 型。其中,A 类有 25 株,其中 14 株携带 *floR* 基因,核苷酸同源性达 80% 以上的菌株有 6 株,分别为 170313-1F9、171103-1P1、171103-2F1、171103-3F3、170313-2F4 和 1144,该 6 株可分为 3 种 RAPD 型,剩下 19 株每株各 1 个 RAPD 型,共 22 种型;B 类有 3 株,共 3 种 RAPD 型,有 1 株携带 *floR* 基因。A 和 B 2 大类 28 株 APP 共被分为 25 种 RAPD 型。

3 讨论

APP 是猪传染性胸膜肺炎的特异病原菌,其可与其他病

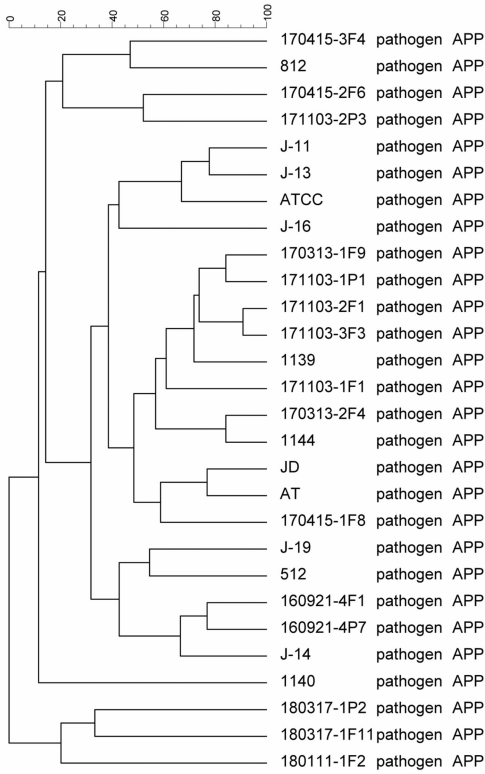


图5 RAPD 图谱的进化树状图

原菌继发感染此呼吸道疾病,如巴氏杆菌、副猪嗜血杆菌等,也可继发性疾病,如猪繁殖与呼吸障碍综合征、伪狂犬病毒病等。该病原菌无明确的选择性培养基,所以在分离鉴定时很难除去杂菌,纯化难度大,导致此菌不能或很难分离^[16]。APP 对培养基和培养条件要求特殊,且生长缓慢,菌落含菌量少。若应用枪尖法(采用移液枪枪尖直接沾取少量细菌固体培养物于 PCR 管中,加 PCR 试剂进行反应)不利于 PCR 扩增。根据 PCP 流行病学特点,本研究主要于 3—4 月及 9—12

月集中分离病原菌并从 206 份病料(患猪肺脏、脾脏、支气管等)中成功分离鉴定出 28 株 APP。鉴定关键是充分运用菌液 PCR 检测技术,来源于 Schaller 等根据 *ApxIV* 基因设计引物建立的方法^[1]。

近年,国内集约化养殖场对抗生素的需求量越来越大,甚至长期使用抗生素治疗、控制养殖场的患病猪。临床上,细菌对抗菌药不敏感的现象屡见不鲜,甚至出现高强度耐药或多重耐药,包括 APP 对 FFC 耐药,如车勇良等分离鉴定的 APP 对 FFC 出现耐药现象^[17]等。APP 对 FFC 的耐药性还可能与地域有关,例如 Kucerova 等从分离的 APP 中检测出对 FFC 耐药率为 0.8%,并从所有耐 FFC 的菌株中均检测出 *floR* 基因^[7]。王涛等报道其在苏北地区分离鉴定的 3 株 APP 对 FFC 高度敏感^[18]。Bossé 等从耐 FFC 的 APP 中提取质粒(pM3446F)测得序列并表明含有 *floR* 基因^[8]。张东超等在天津某规模猪场分离鉴定的 APP 临床株中,测试其药物敏感性试验发现对 FFC 高度敏感^[19]。国外也报道过 APP 的临床分离株对 FFC 敏感^[9-11]。APP 对 FFC 耐药最根本的原因是菌株体内 *floR* 等基因的表达导致其对 FFC 耐药。

本试验测试分离株 APP 对 FFC 的耐药率为 14.29%,但 *floR* 的检出率(53.57%)显著高于 APP 对 FFC 的耐药率,这显然说明 *floR* 基因在部分 APP 体内不表达或低表达,因此导致其对 FFC 不能耐药。FFC 作为动物专用广谱抗生素,本研究表明其对多数 APP 的抗菌活性较高,在临床对治疗 APP 感染仍有较高的应用价值。*floR* 基因在国外 APP 中有研究报道^[20-21],但在国内 APP 分离株中尚未见有检出的报道,而本研究在国内首次检测出 *floR* 基因,*floR* 基因在 APP 中的检出应引起重视。

目前,细菌基因分型的方法主要包括随机扩增多态性 DNA(RAPD)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点序列分型(MLST)、肠杆菌基因间重复序列 PCR(ERIC-PCR)和基因外重复回文序列 PCR(REP-PCR)等。本研究采用的 RAPD 分型方法简单易行,是由 Williams 等在 PCR 技术的基础上首创的 1 种基因分型方法,运用随机引物扩增以寻找多态性 DNA 片段,其扩增周期短且无放射性,可用肉眼观察^[22]。RAPD 的条带越相近,说明其核苷酸的同源性越高,亲缘性越近,为克隆传播。采用 GelCompar II 6.6 软件生成进化树状图,发现此分离株共被分成几乎不存在同源性的两大类(A 和 B 类)。A 类被分为 22 种型,B 类被分为 3 种型,共 25 种 RAPD 型。携带 *floR* 基因的菌株大多集中在 A 类,且含 *floR* 基因的菌株核苷酸同源性多在 40%~80% 间,表明来自不同省份分离株的核苷酸同源性差异较大,含有 *floR* 基因菌株间的核苷酸的同源性较低,说明携带 *floR* 基因的 APP 临床分离株之间的遗传关系较远,多数来自不同的克隆,*floR* 基因在试验菌株间主要是以水平方式传播。

参考文献:

[1] Schaller A, Djordjevic S P, Eamens G J, et al. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001, 79(1): 47-62.

[2] 隋慧. 锦州地区猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2012(6): 3366-3367.

[3] 葛兆宏, 陆广富, 陶洁, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌变异株的分离与鉴定[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2012, 33(4): 10-13.

[4] 田永祥, 檀永强, 刘泽文, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定、致病性与药敏试验[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(21): 5204-5207.

[5] 余波, 杨莉, 王芳, 等. 贵州省猪传染性胸膜肺炎放线杆菌核酸检测及其耐药性调查[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(6): 128-130.

[6] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 252-253.

[7] Kucerova Z, Hradecka H, Nechvatalova K, et al. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150(1/2): 203-206.

[8] Bossé J T, Li Y, Atherton T G, et al. Characterisation of a mobilisable plasmid conferring florfenicol and chloramphenicol resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 178(3/4): 279-282.

[9] Priebe S, Schwarz S. *In vitro* activities of florfenicol against bovine and porcine respiratory tract pathogens[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2003, 47(8): 2703-2705.

[10] Gutiérrez - Martín C B, Blanco N D, Blanco M, et al. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, isolated from pigs in Spain during the last decade[J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(1): 218-222.

[11] Matter D, Rossano A, Limat S, et al. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122(1/2): 146-156.

[12] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28(5): 519-542.

[13] Lee J H, Choi S J. Isolation and characteristics of sorbitol - fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle[J]. *Microbes and Infection*, 2006, 8(8): 2021-2026.

[14] Watts J L. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard[M]. 4th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

[15] Liu B, Wu H, Zhai Y, et al. Prevalence and molecular characterization of *oqxAB* in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals and humans in Henan Province, China [J]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2018, 7(1): 18.

[16] 余光勇. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定及 *Apx I A*、*TbpB* 基因的克隆和原核表达研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.

[17] 车勇良, 陈如敬, 吴学敏, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *养猪*, 2016(6): 102-104.

[18] 王涛, 陈广仁, 蔡丙严. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(10): 207-208.

[19] 张东超, 杨宁宁, 林静, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(6): 1604-1609.

谭露霖,张定红,张洁,等.金荞麦对肉仔鸡抗氧化功能、肠道屏障功能及血清生化指标的影响[J].江苏农业科学,2019,47(21):232-235.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.056

金荞麦对肉仔鸡抗氧化功能、肠道屏障功能及血清生化指标的影响

谭露霖,张定红,张洁,邓蓉

(贵州省畜牧兽医研究所,贵州贵阳 550005)

摘要:旨在研究饲料中添加金荞麦对肉仔鸡生长性能、抗氧化功能、肠道屏障功能及血清生化指标的影响。选择 1 日龄铁脚麻肉仔鸡 270 羽,随机分为 3 组(I、II、III),每组 6 个重复,每个重复 15 羽鸡。I 组为对照组,饲喂基础饲料,不添加任何抗生素;II 组为抗生素组(添加 8% 黄霉素 60 mg/kg 和 15% 金霉素 270 mg/kg),III 组在基础饲料中添加 1% 金荞麦,试验期为 21 d。结果表明,21 日龄时,II、III 组血清和空肠黏膜的丙二醛含量显著低于 I 组($P < 0.05$),II、III 组血清总抗氧化能力、空肠黏膜超氧化物歧化酶活性显著高于 I 组($P < 0.05$),III 组血清谷胱甘肽过氧化物酶活性显著高于 I、II 组($P < 0.05$)。21 日龄时,II、III 组空肠黏膜二胺氧化酶显著高于 I 组($P < 0.05$)。21 日龄时,II、III 组血清总胆固醇、甘油三酯、尿素氮含量显著低于 I 组($P < 0.05$)。I、II、III 组间谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总蛋白、白蛋白含量差异不显著($P > 0.05$)。由此可见,1~21 日龄期间,饲料中添加适量的金荞麦可促进肉仔鸡血清抗氧化酶、空肠黏膜抗氧化酶分泌,提高机体抗氧化功能;增加肠道黏膜中二胺氧化酶含量,改善肠道屏障功能,降低血清总胆固醇、甘油三酯、尿素氮水平。

关键词:金荞麦;肉仔鸡;生长性能;抗氧化功能;肠道屏障功能;血清生化指标

中图分类号:S816.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)21-0232-04

近年来,随着我国养殖业的不断发展,长期高强度提高生长速度的选育方式及集约化的养殖模式^[1],导致家禽面临着免疫功能下降、抗病力弱、应激等一系列问题,严重影响禽业发展,因此如何通过营养调控手段改善这种现状,提高鸡群抗应激能力、抗氧化能力、肠道健康和生长性能,显得尤为突出^[2]。金荞麦[*Fagopyrum Dibotrys* (D. Don) Hara]为蓼科荞麦属植物,普遍存在于陕西、浙江、四川、贵州等省。根、茎、叶皆可入药,在世界范围内被广泛使用。据文献报道,金荞麦中含有多酚类^[3]、黄酮类、蒽类、有机酸^[4]等化学成分。金荞麦具有抗癌、抗炎、抗氧化、杀菌、降血糖、调节血脂等功效^[4-5]。韩勇等研究报道,金荞麦营养价值高、必需氨基酸含量丰富、

消化率高,适合动物消化吸收^[6]。金荞麦添加于仔猪饲料中,能降低仔猪肠道中有害菌的含量,改善仔猪肠道微生物环境,增强仔猪肠道健康^[7];金荞麦饲喂猪可以提高屠宰性能、改善肉质^[8];金荞麦还能够促进禽流感疫苗对鸭群的免疫水平^[9];金荞麦超微粉还能提高小鼠机体的特异性免疫和非特异性免疫功能,促进机体的生长发育^[10];由于饲料中抗生素的限用和禁用是我国畜牧业发展的大趋势,而中草药添加剂的独特功效已被广泛关注。但目前金荞麦在家禽上的应用报道甚少,因此本试验以铁脚麻鸡为试验动物,研究金荞麦对肉仔鸡抗氧化功能、肠道屏障功能及血液生化指标的影响,为金荞麦作为添加剂在肉仔鸡中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验选取体质量相近的 1 日龄铁脚麻肉雏公鸡 270 羽,随机分为 3 组(对照组、抗生素组、金荞麦组),每组 6 个重复,每个重复 15 羽鸡,各重复之间体质量接近。对照组饲喂不添加任何抗生素的玉米-豆粕型基础饲料,基础饲料参照美国 NRC(1994)和《鸡饲养标准》(NY/T 33—2004)配制,基础饲料组成及营养水平详见表 1。试验组饲喂在基础饲料中

收稿日期:2018-07-20

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2014GB2F200250);黔农科院青年基金(编号:[2017]20);贵州省科技成果重点推广计划(编号:[2013]5084)。

作者简介:谭露霖(1991—),女,贵州印江人,硕士,助理研究员,主要从事动物营养与饲料科学研究。E-mail:359362195@qq.com。

通信作者:邓蓉,硕士,副研究员,主要从事牧草生产与应用研究。E-mail:dr17@163.com。

[20] Da Silva G C, Rossi C C, Santana M F, et al. p518, a small floR plasmid from a South American isolate of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 204: 129-132.

[21] Li Y H, Li Y W, Crespo R F, et al. Characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* SXT-related integrative and conjugative element ICE_{Ap2} and analysis of the encoded FloR

protein: hydrophobic residues in transmembrane domains contribute dynamically to florfenicol and chloramphenicol efflux[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2018, 73(1): 57-65.

[22] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.