

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

FEB.2017 Volume 42, Number 1 (Total No.191)

Main Content

- Study on Natural Quorum Sensing Inhibitor of Bacteria·····Ma Yanping, Liang Zhiling, et al(1)
- The Development of Compound Vitamin Nanoemulsion and Its Application in Livestock Husbandry·····
·····Wang Xiaoqing, Zhang xin,et al(6)
- Reasons and Solution of Low Hatchability of Breeding Egg from Broiler Breeders with Normal
Fertilization Rate·····Li Long(11)
- Effect of Diet Factors on Protein Fermentation in Hindgut of Broilers·····Zhang Lulu,WangDongsheng(15)
- Recent Research Advances in Swine Nutrition in China····· Wang Li, Li Ping,et al(22)
- Diagnosis and Control of Hydropericardium Hepatitis Syndrome in Commercial Yellow Feather Broilers
·····Lu Shousheng, Sun Yanwei,et al(24)
- Diagnosis and Treatment of Mycoplasma Synoviae in Yellow Feather Broilers·····
·····Liang Shengchang,Chen Li(27)
- Diagnosis and Control of the Eastern Region of New Proposed Semi Muscovy Duck Gosling Plague
·····Sun Jiantao, Wang Jiafa,et al(29)
- Studies on the Protective Effect of BidensPilosa L. Granules Against Acute Liver Injury in Chicken···
·····ZhongYongFeng, Liu Zhichang,et al(31)
- Inducing and Differentiating Chicken Bone Marrow Dendritic Cells in Vitro·····
·····He Jingyi, Luo Chenglong(34)
- Establishment of an ELISA Assay for the Detection of NS1 Protein of Duck Tembusu Virus ·····
·····Sun Minhua, Guo Jianwei, et al(37)
- Clinical Diagnosis and Treatment of Breast Fibroadenoma of the Cat·····Ye Jingyue,ChenYizhou(41)
- Diagnosis and Treatment of a Case of Canine Bullous Keratitis·····Qi Shengkui(44)
- Prevention and Control of Epidemic Investigation of the Digestive Tractat in Parasitic Dairy Cows in the
Junction of Heibei, Shangdong and Henan Provinces·····Liu Chengjun,Liu Fenghui,et al(46)
- Notification for Purchase and Transportation of Sheep·····Guo Bingquan, Che Xiaonan, et al(48)
- Research on influential factors of Veterinary drug security based on Chinese Herbal Addictives·····
·····Liao Weiguang,Li Yicai(50)

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

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;LIN Weijun

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

Post Code: 510500

Tel: (020)38319957 38319211

Fax: (020)38319211

E-mail:gdxmsykj@163.com

细菌天然群体感应信号分子抑制剂研究进展

马艳平*, 梁志凌, 马江耀, 郝乐, 柯浩, 刘振兴*

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

摘要: 长期抗生素滥用导致了多重耐药菌株及其超级细菌的出现, 由密度感应系统调控的生物被膜的形成和成熟是造成细菌感染的机制之一。自然界存在的生物活性物质能够淬灭密度感应系统, 这些生物活性物质被称为群体感应信号分子抑制剂(quorum sensing inhibitor, QSI)。近年来, 群体感应抑制剂成为细菌抗感染药物开发的靶点, 有必要对细菌群体感应信号分子抑制剂种类、作用机制进行研究, 本文综述了细菌天然群体感应信号分子抑制剂, 干扰群体感应系统, 从而治疗细菌感染。绝大多数原核生物能够产生群体感应抑制剂, 这被认为是安全的。动物、豆类、传统的药用植物、海洋生物均能产生群体感应抑制剂。这些天然抑制剂可能替代传统抗生素, 具有广阔的研究和应用前景。

关键词: 群体感应系统; 细菌群体感应信号分子抑制剂; 种类; 机理

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0001-05

Study on Natural Quorum Sensing Inhibitor of Bacteria

Ma Yanping*, Liang Zhiling, Ma Jiangyao, Hao Le, Ke Hao, Liu Zhenxing*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock Disease Prevention, Guangdong Public Lab. of Veterinary Public Health, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Excessive and indiscriminate use of antibiotics to treat bacterial infections has led to the emergence of multiple drug resistant strains and super bacteria. Most infectious diseases are caused by bacteria which proliferate within quorum sensing (QS) mediated biofilms. These molecules act primarily by quenching the QS system. The molecule is also termed as quorum sensing inhibitor (QSI). In recent years, the quorum sensing inhibitors become the target of the development of bacterial resistance to infection drugs, it is necessary to study bacterial quorum sensing signal molecule inhibitors types and mechanism. This review focuses detailedly on natural QSIs with the potential for treating bacterial infections. It has been opined that the most versatile prokaryotes to produce QSI are likely to be those, which are generally regarded as safe. Among the eukaryotes, certain legumes and traditional medicinal plants are likely to act as QSIs. Such findings are likely to lead to efficient treatments with much lower doses of drugs especially antibiotics than required at present.

Key words: Quorum sensing system; Quorum sensing inhibitor; Types; Mechanism

细菌间通过分泌化学信号分子来检测菌群密度和调控细菌的多种生理功能, 从而适应周围环境变化, 这种信息交流系统称为密度感应系统。密度感应系统与细菌生物膜形成密切相关, 细菌通过生物被膜增加其耐药性, 从而使传统的抗生素疗效降低。这就为未来细菌抑制剂的合成提供重

要的治疗靶点和研究方向。研究密度感应信号抑制剂(QSI)干扰细菌群体感应, 使细菌难以形成细菌生物被膜, 从而减轻细菌抗药性, 具有重要的实践意义和临床意义。本文系统地综述了天然细菌密度感应信号分子抑制剂。

1 细菌密度感应系统

收稿日期: 2016-12-07

基金项目: 广东省海洋渔业局科技与产业发展专项(A201401C06), 广州市科技攻关(2014J4100229)。

作者简介: 马艳平(1984-), 女, 硕士, 山东德州人, 主要从事水产病害学研究。E-mail: mayanping2292@163.com

*: 通讯作者

1970年Nealson等^[1]首次报道了海洋费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)的发光现象与菌体的密度有关,降低细菌细胞的密度,可终止细菌发光。1994年Fuqua等^[2]首次提出了“群体感应”(Quorum sensing, QS)这一概念。即细菌能够通过分泌群体感应信号感应自身和周围其他种群数量变化的能力。当信号分子积累到一定的浓度后,就能和细胞质中信号分子的受体蛋白相结合,进一步激活靶基因的表达,密度感应协调一些生物效应的增强,如生物发光、毒力因子调控、抗药性产生和生物膜结构的稳定、质粒转移、胞外蛋白酶产生、DNA摄取能力、细菌细胞表面点动力学特性等^[3-5]。

密度感应系统有三种主要的信号系统。一种是革兰氏阴性细菌利用酰基高丝氨酸内酯(acyl-homoserine lactone, AHL)及其类似物,即AI-1信号系统,调控细菌外毒力因子表达,被认为是细菌种内的信号识别系统。一种是革兰氏阳性细菌利用寡肽类自诱导物感知自身种群数量。另一系统是依赖吡喃酰硼酸二酯(luxS)的AI-2系统,大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有高度保守的luxS同系物,被认为是细菌中间的信号识别系统。

2 细菌密度感应信号分子抑制剂作用机理

任何能够阻止密度感应信号分子发挥作用或受体识别信号分子的识别过程的物质都可以作为密度感应信号分子抑制剂,其作用机制主要有三种:①合成信号分子的类似物,可以利用合成信号分子底物的类似物来阻断密度感应信号分子的形成,例如类似物有ACP同系物、L/D-S-腺苷高半胱氨酸和丁酰-S-腺苷蛋氨酸等^[6]。②抑制AHLs信号分子与受体蛋白的结合,这种作用机制是目前构建药物筛选模型的理想靶点。③降解酶可以促进密度感应信号分子的降解。已在细菌中发现有许多降解AHLs的群体感应淬灭酶,如细菌的酰基转移酶和内酯酶。

3 细菌密度感应信号分子抑制剂分类

细菌密度感应信号分子抑制剂按来源区分,可分为天然密度感应信号分子抑制剂和人工合成密度感应信号分子抑制剂。按成分区别,可分为:①吡喃酮类、高丝氨酸内酯类似物、内酯类、AI-2类似物等非肽类小分子,②肽类物质,③HL抗体类、QS降解酶类等蛋白质物质。而天然密度感应信号分子抑制剂按来源区分,可分为原核生物类

QSI,动物类QSI,植物类QSI,海洋生物类QSI,真菌类QSI和抗体类QSI。

4 天然密度感应信号分子抑制剂

4.1 原核密度感应系统抑制剂

相当一部分原核生物能合成群体感应淬灭酶。包括:①放线菌门-红球菌属和链霉菌属,②厚壁菌门-节杆菌属、芽孢杆菌属和海洋芽孢杆菌属,③蓝藻菌门-鱼腥藻属,④拟杆菌门-黄杆菌属,⑤变形菌门-不动杆菌属、葡萄农杆菌、交替单胞菌,丛毛单胞菌、嗜盐单胞菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、青枯菌、根癌农杆菌等^[6-12]。在青枯菌株XJ12B和铜绿假单胞菌株PA01存在多种AHL-酰基转移酶,但只有39%的同源性^[7, 13-14]。希瓦氏菌基因组发现了阿库来菌素A酰基转移酶(AAC),但是这个基因并没有AHL降解活性,与青枯菌XJ12B(AiiD)和铜绿假单胞菌(PvdQ)只有32%~36%的同源性^[15]。丁香假单胞菌株B728a基因组发现两个可能的酰化酶-HacA和HacC,具有QS信号-AHL降解活性^[16]。链霉菌存在的AHL-酰化酶能特异地降解拥有6个或6个以上碳原子的酰基链的AHLs^[17]。相似地,铜绿假单胞菌产生的AHL-酰基转移酶能特异性降解3-oxo-C12-HSL,但是不能降解C4-HSL^[18]。鱼类病原菌海刺芹黄杆菌酰基转移酶降解长链酰基AHLs(C10-HSL)抑制生物被膜的形成^[19]。研究发现,不同芽孢杆菌属细菌-蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌发现了AHL-内酯酶类似物^[20-21]。另一方面,存在于根癌农杆菌AHL内酯酶(AttM)与节杆菌和肺炎克雷伯菌AttM拥有30%~50%的相似性^[7]。总之,不同的原核生物被发现存在AHL-酰基转移酶或者内酯酶,比较基因组研究也发现在同一个生物体存在这两种酶,例如耐辐射球菌R1,生丝单胞菌、发光杆菌*laumondii*亚种、红串红球菌等^[22-23]。

4.2 动物类密度感应系统抑制剂

群体密度感应淬灭酶也存在于一些动物中,例如小鼠、大鼠和斑马鱼。Dong等^[7]证明猪肾脏酰基转移酶I能够灭活密度感应信号-C6HSL和3OC12HSL,但是不能灭活C4HSL信号分子。Paul等证明酰基转移酶I有效地减少嗜水气单胞菌和恶臭假单胞菌生物被膜的形成。哺乳动物氧磷酶(PONs)具有酯类和内酯类水解活性,与药物的新陈

代谢和神经毒物的解毒作用息息相关^[24]。Stoltz 等^[25]报道人类上皮细胞能够灭活铜绿假单胞菌 AHLs。Yang 等^[26]报道牛、羊、马、鼠和兔的血清也发现了密度感应信号抑制剂。Lu 等^[27]报道土耳其肉饼、鸡胸肉、奶酪和牛排等动物类食品对密度感应信号 AI-2 有 84.4%~99.8% 的抑制率。家禽类长链脂肪酸对哈维氏弧菌 BB170 菌株 AI-2 活性有 25%~99% 的抑制率, Widmer 等通过试验证实这些抑制剂导致了哈维氏弧菌 BB170 菌株毒力基因表达下调, 降低了 87.5% 生物发光活性^[28-29]。Soni 等^[30]证明绞碎的牛肉也含有密度感应信号抑制剂, 从而导致哈维氏弧菌生物发光活性降低 90% 以上。蜂蜜和蜂胶具有密度感应信号抑制活性, 与其中含有的黄酮类和酚类物质等抗菌成分密切相关。Truchado 等检测了蜂蜜对紫色色杆菌的 QS 抑制活性, 证明即使在 0.1 kg/L 低浓度作用下, 紫色色杆菌的紫色杆菌素也明显下降^[31-32]。

4.3 植物类密度感应系统抑制剂

一些植物提取物与密度感应信号具有相似的化学结构, 能够干扰信号识别受体从而发挥抑制活性。植物 γ -氨基丁酸可以作为葡萄农杆菌 AHL 信号 -OHC8HSL 内酯酶的启动子, 从而减弱葡萄农杆菌密度感应系统依赖的感染过程^[33]。药用植物焦性没食子酸提取物以及类似物具有 AI-2 信号分子抑制活性^[34]。漂白亚麻纤维卷种子渗出物 L-刀豆氨酸影响了苜蓿根瘤菌密度感应系统的表达^[36]。

西柚呋喃香豆素能够抑制哈维氏弧菌报告菌株 BB886 和 BB170 AI-1 和 AI-2 活性, 并能抑制大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌等病原菌生物被膜的形成。提纯的呋喃香豆素对信号分子具有 94.6%~97.7% 的抑制率^[35]。酸橙种子内的柠檬苦素类似物, 例如异柠檬酸、双乙酰非离子酸性 17 β -D 吡喃葡萄糖苷能抑制哈维氏弧菌 AI-2 90% 的活性^[37]。柠檬苦素类似物也能有效抑制 HAI 和 AI-2 介导的生物发光效应。进一步研究发现呋喃香豆素和柠檬苦素类似物含有具有密度感应系统抑制剂效应的呋喃酮^[38]。

黄酮被认为是抗氧化剂、抗炎分子和抗癌分子。黄酮例如柚皮素、山奈酚、槲皮素能够抑制哈维氏弧菌 BB886 和 MM32 菌株 HAI-1 和 AI-2 介导的生物发光效应。研究发现柚皮素和槲皮素能够有效抑制哈维氏弧菌 BB120 和大肠杆菌 O₁₅₇:H₇ 菌

株的生物被膜形成^[37]。一些药用植物提取物具有密度感应抑制剂活性, 例外白花老鹤草、月桂、苦苣菜、大蒜、槟榔、三七、垂笑君子兰叶、硬骨凌霄花可抑制枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、紫色色杆菌等细菌的信号传导^[39-40]。

4.4 海洋生物密度感应系统抑制剂

海洋红藻生成的卤代呋喃酮通过和细菌竞争 AHL 信号分子的受体结合位点 (LuxR) 抑制密度感应系统活性, 使之不能在叶表产生群聚和形成生物被膜^[41]。莱茵衣藻分泌的一些化合物被发现作为细菌信号分子的模拟物干扰密度感应系统^[42]。另外一些藻类生成的溴代过氧化物酶也能被开发作为密度感应系统抑制剂破坏 AHL 信号^[43]。韩国红藻扇形拟伊藻生成的 α -D-半乳糖-甘油、左旋水苏碱和乙二磺酸也可以作为密度感应系统抑制剂^[44]。Rasmussen 等报道 284 种澳大利亚海岸海洋生物的提取物, 其中有 100 多种提取物具有密度感应系统抑制剂活性^[45-46]。一些海洋细菌例如蓝藻细菌能够抑制密度感应系统基因的表达, Romero 等^[47]报道相当一部分海洋细菌具有密度感应系统抑制剂活性和高丰度的密度淬灭基因。

4.5 真菌类密度感应系统抑制剂

众所周知真菌能生成抗生素, 由青霉菌生成的盘尼西林有效地控制了细菌的感染, 从而阻止细菌生物被膜的形成。现在大约 33 种青霉菌能够产生 QSI-棒曲霉素和青霉素^[46]。而子囊菌门和担子菌门真菌能够通过内酯酶活性降解密度感应信号分子^[48]。黑木耳产生的天然染料能够作为密度感应系统抑制剂抑制青紫色杆菌青紫色杆菌素的生成^[49]。

4.6 抗体类密度感应系统抑制剂

AHLs 及其相关信号分子均为小分子物质, 没有免疫原性。但是细菌体内一部分凋亡因子和 NF-Kappa B 调节因子的表达受到 AHL 系统的调控。Kaufmann 等^[51]报道抗 3-oxo-AHL 类似物 RS2 的 RS2-IG9 抗体能淬灭铜绿假单胞菌 30C12HSL 信号分子, 但是不能干扰短链 AHL 信号分子, 进一步研究 AHL 抗体可以预防小鼠巨噬细胞初级骨髓细胞坏死^[50], 之后大量的抗体确定具有降解铜绿假单胞菌 30C12HSL 的活性, 其中最有效的抗体为 XXD-11G2, 将 30C12HSL-BSA 蛋白免疫小鼠产生特异性抗体, 随后用铜绿假单胞菌攻毒, 结果显示免疫组提高了 36% 的存活率, 同时肿瘤坏死因子

(TNF- α)表达水平相较于对照组明显降低。由此看来抗体的作用机制可能是降低了宿主的炎症反应^[52]。

5 展望

通过破坏病原细菌的密度感应系统来抵抗病原菌的感染,有望替代抗生素的作用。QS 干扰分子与传统抗生素不同,它不会杀死细菌或抑制单个细菌的生长,因此不易诱导耐药突变。研究表明病原菌的毒力因子的表达与密度感应系统密切相关,因此开发高效细菌密度感应系统抑制剂,具有广阔的应用前景。深入研究天然存在的群体密度感应系统抑制剂,了解其作用机制,从而合成更多有效的抑制剂类似物、降解酶、以及合成能抑制 AHLs 信号分子与受体蛋白的结合的药物。

参考文献:

- [1] Nealson K H, Piatt T, Hastings J W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system[J]. *J Bacteriol*, 1970, 104(1):313-322.
- [2] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E R. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators [J]. *J Bacteriol*, 1994, 176(2):269-275.
- [3] Burkhart C N, Burkhart C G. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* may not be the major issue clinically or microbiologically in acne[J]. *Br J Dermatol*, 2003, (148):363-384.
- [4] Balestrino D, Haagensen J A, Rich C, et al. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187:2870-2880.
- [5] Bassler B L, Wright M, Silverman M R, et al. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway[J]. *Mol Microbiol*, 1994, 13: 273-286.
- [6] Kalia V C, Purohit H J. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37:121-140.
- [7] Dong Y H, Zhang L H. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes[J]. *J Microbiol*, 2005, 43:101-109.
- [8] Huma N, Shankar P, Kushwah J, et al. Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21:1001-1011.
- [9] Kang B R, Lee J H, Ko S J, et al. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010935-941[J]. *Can J Microbiol*, 2004, 50:935-941.
- [10] Park S Y, Lee S J, Oh T K, et al. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria[J]. *Microbiol*, 2003, 149:1541-1550.
- [11] Romero M, Martín-Cuadrado A, Roca-Rivada A, et al. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, 75:205-217.
- [12] Uroz S, Dessaux Y, Oger P. Quorum sensing and quorum: the yin and yang of bacterial Communication[J]. *Chem-biochem*, 2009, 10:205-216.
- [13] Huang J J, Han J I, Zhang L H, et al. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69:5941-5949.
- [14] Lin Y H, Xu J L, Hu J, et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47:849-860.
- [15] Tait K, Williamson H, Atkinson S, et al. Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signaling[J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11:1792-802.
- [16] Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, et al. Metagenome derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75:224-238.
- [17] Park S Y, Kang H O, Jang H S, et al. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71:2632-2641.
- [18] Sio C F, Otten L G, Cool R H, et al. Quorum quenching by an N-Acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Infect Immun*, 2006, 74:1673-1682.
- [19] Romero M, Avendaño-Herrera R, Magariños B, et al. Acyl-homoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) group [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 304:131-139.
- [20] Chan K G, Wong C S, Yin W F, et al. Rapid degradation of N-3-oxoacylhomoserine lactones by a *Bacillus cereus* isolate from Malaysian rainforest soil[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010, 98:299-305.
- [21] Huma N, Shankar P, Kushwah J, et al. Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21:1001-1011.
- [22] Liu D, Momb J, Thomas PW, et al. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures [J]. *Biochemistry*, 2008, 47:7706-7714.
- [23] Uroz S, Oger P M, Chapelle E, et al. A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74:1357-1366.
- [24] Paul D, Kim Y S, Ponnusamy K, et al. Application of quorum quenching to inhibit biofilm fermentation[J]. *Environ Eng Sci*, 2009, 16:1319-1324.

- [25] Stoltz D A, Ozer E A, Ng C J, et al. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292:852-860.
- [26] Yang F, Wang L H, Wang J, et al. Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579:3713-3717.
- [27] Lu L G, Hume M F, Pillai S D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives[J]. *J Food Prot*, 2004, 67:1457-1462.
- [28] Widmer K W, Jesudhasan P R, Dowd S E, et al. Differential expression of virulence-related genes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium luxS mutant in response to autoinducer AI-2 inhibitor and poultry meat-derived AI-2 inhibitor[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2007(4):5-15.
- [29] Widmer K W, Soni K A, Hume M E, et al. Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to Antiinducers-2(AI-2)[J]. *J Food Sci*, 2007, 72:M363-368.
- [30] Soni K A, Lu L, Jesudhasan P R, et al. Influence of autoinducer-2(AI-2) and beef sample extracts on *E. coli* O₁₅₇:H₇ survival and gene expression of virulence genes *yadK* and *hhA*[J]. *J Food Sci*, 2008, 73:M135-139.
- [31] Aljadi A M, Yusoff K M. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties[J]. *Turkish J Med Sci*, 2003, 33:229-236.
- [32] Truchado P, López-Gálvez F, Gil M I, et al. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics[J]. *Food Chemistry*, 2009, 115:1337-1344.
- [33] Chevrot R, Rosen R, Haudecoeur E, et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:7460-7464.
- [34] Ni N, Choudhary G, Li M, et al. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18:1567-1572.
- [35] Gonzalez J E, Keshavan N D. Messing with bacterial quorum sensing[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70:859-875.
- [36] Girenavar B, Cepeda M L, Soni K A, et al. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria[J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 125:204-208.
- [37] Vikram A, Jesudhasan P R, Jayaprakasha G K, et al. Citrus limonoids interfere with *Vibrio harveyi* cell-cell signaling and biofilm formation by modulating the response regulator *LuxO*[J]. *Microbiolo*, 2011, 157:99-110.
- [38] Lønn-Stensrud J, Petersen F C, Benneche T, et al. Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, 22:340-346.
- [39] Koh K H, Tham F Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum sensing inhibitors activity[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2011, 44:144-148.
- [40] Bosgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Ugur A, et al. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*[J]. *Curr Microbiol*, 2007, 55:114-118.
- [41] Gram L, de Nys R, Maximilien R, et al. Inhibitory effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* on swarming motility of *Proteus mirabilis*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62:4284-4287.
- [42] Teplitski M, Chen H, Rajamani S, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134:137-146.
- [43] Borchardt S A, Allain E J, Michels J J, et al. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:3174-3179.
- [44] Kim J S, Kim Y H, Seo Y W, et al. Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*[J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2007, 12:308-311.
- [45] Rasmussen T B, Bjarnsholt T, Skindersoe M E, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector[J]. *J Bacteriol*, 2005a;187:1799-1814.
- [46] Rasmussen T B, Skindersoe M E, Bjarnsholt T, et al. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species [J]. *Microbiolo*, 2005b, 151:1325-1340.
- [47] Romero M, Martín-Cuadrado A, Roca-Rivada A, et al. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine caesatal microbial communities[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, 75:205-217.
- [48] Uroz S, Heinonsalo J. Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 65:271-278.
- [49] Uroz S, Heinonsalo J. Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 65:271-278.
- [50] Zhu H, He C C, Chu Q H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 52:269-274.
- [51] Kaufmann G F, Park J, Mee J M, et al. The quorum quenching antibody RS2-1G9 protects macrophages from the cytotoxic effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45:2710-2714.
- [52] Miyairi S, Tateda K, Fuse E T, et al. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55:1381-1387.

纳米微乳维生素的研究及应用进展

王小庆, 张鑫, 程怀灵, 魏平华

(广州格雷特生物科技有限公司, 广东 广州 510730)

摘要: 纳米微乳是粒径介于 10~100 nm 的特殊乳剂, 能够提高易降解物质的生物利用度和对环境的耐受性, 具有诸多优点。维生素又是畜禽机体代谢中不可缺少的物质, 影响动物健康和生长生产性能。将纳米微乳技术运用到复合维生素生产制作中, 弥补了传统工艺生产的复合维生素添加量大、吸收率低等缺点。本综述对纳米微乳的基本概念和类型, 制备方法以及纳米微乳维生素在畜禽生产上的应用研究作一简述。

关键词: 纳米微乳; 复合维生素; 畜禽生产

中图分类号: S816.72

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0006-05

The Development of Compound Vitamin Nanoemulsion and Its Application in Livestock Husbandry

Wang Xiaoping, Zhang xin, Cheng Huailing, Wei Pinghua

(Guangzhou Great Biological Technology Limited Company, Guangzhou 510730, China)

Abstract: Nanoemulsion is a kind of emulsion which partical size is 10-100 nm and has many advantages such as improving bioavailability of degradable materials and tolerance to environment. Vitamin is essential nutriment for metabolism of animals and beneficial to animals' health and production performance. So the application of nanotechnology in compound vitamin production can cover the shortage of traditional technology that the compound vitamin is high consumption and low absorptivity. This review is aimed to make a description of nanoemulsion including conception, type and preparation method as well as application of compound vitamin nanoemulsion in livestock husbandry.

Key words: nanoemulsion; compound vitamin; livestock husbandry

纳米微乳维生素就是采用一定的方法, 把维生素微粒粉碎到 100 nm 以下, 运用纳米微乳技术制作成纳米微乳维生素。新型的纳米微乳维生素能够显著改善畜禽的肉品质、生产性能、免疫机能和繁殖功能。在畜禽生产中运用效果好、添加量少、吸收利用好, 越来越受到畜禽研究者的重视。

1 纳米微乳的概念和机理

纳米微乳是粒径在纳米级的特殊乳剂, 属于微乳范畴, 但比一般微乳要小, 其粒径在 1~100 nm 之间, 由油、水、表面活性剂和助表面活性剂按

适当比例混合而成, 是一种热力学稳定, 各向同性, 透明或半透明的均相分散系。

纳米微乳的基本结构可以分为三种: (1) Winsor I 型, 即油包水 (W/O) 型纳米微乳, 水相分散于油相中, 表面覆盖一层由表面活性物质(表面活性剂与助表面活性剂)分子构成的单分子膜, 分子极性端朝着连续的水相, 非极性端朝着油相, 纳米微乳与多余的油相(上相)共存, 纳米微乳与油相间的界面张力远小于水相间的界面张力。W/O 型纳米微乳可延长水溶性药物的释放时间, 起缓释作

收稿日期: 2016-12-04

基金项目: 新型纳米微乳维生素关键技术创新研究(2017010160482)

作者简介: 王小庆(1986-), 女, 重庆丰都人, 主要从事畜禽饲料添加剂及生物制品研究。

E-mail: wangxiaopinghl@outlook.com

用。(2)Winsor II型,即水包油(O/W)型纳米微乳,其结构与W/O型纳米微乳正好相反,油相分散于水相中,纳米微乳与水相间的界面张力远小于油水间的界面张力。O/W型纳米微乳可增加亲脂性药物的溶解度。(3)Winsor III型,即双连续型纳米微乳,双连续相结构中,水相与油相并非球状,而类似于海绵状的结构,连续的水相或油相的宽度亦在纳米尺度范围内。双连续型纳米微乳是W/O型与O/W型之间的过渡状态,实际应用比较少。

关于纳米微乳的形成机理,包括瞬时负界面张力形成理论^[1],增容理论^[2]和热力学理论^[3],这些理论分别从不同角度解释了纳米微乳的形成机理及其某些特殊形成现象、理化性质和行为,但目前尚无统一理论能够对纳米微乳的形成进行全面解释。而对纳米微乳体系相行为的描述则一般通过相图表示。在等温等压条件下,三组分体系的相行为采用平面三角形来表示,称为三元相图。对于四组分体系,则采用正四面体表示。对于四组分或以上的体系,通常采用变量合并法,如固定两组分的配比,使实际独立变量不超过三个,从而仍可用三元相图来表示,这样的相图称为拟三元相图或伪三元相图(Pseudo-ternary phase diagrams)^[4]。相图是筛选纳米微乳处方最有效的方法。该方法将纳米微乳区变成一个平面区域,图形直观,便于确定各组分的比例,目前大部分研究都采用此方法。将油、水、表面活性剂和助表面活性剂按比例混合搅拌即可制备纳米微乳。

2 纳米微乳的制备方法

从相图确定处方后,即可进行制备工艺的选择。制备工艺可影响纳米微乳的粒径及性质,尤其是稳定性。纳米微乳理论上能自发形成,但在实际生产过程中,通常需要借助一定的乳化能量才能形成,乳化能量一般来自机械装置或者组分的化学能。所以,纳米微乳的制备方法从乳化能量来源可分为高能乳化法、低能乳化法和自动乳化法。

2.1 高能乳化法

高能乳化法制备纳米微乳一般分为3种:高压均质匀浆法、超声法和剪切搅拌法,其中,剪切搅拌法可很好地控制粒径,且处方组成有多种选择;超声法在降低粒径方面非常有效,通常采用探头超声仪,但只适合少量样品的制备,探头发热会

产生铁屑并进入药液;高压均质匀浆法可减小因表面活性剂用量增大而产生的毒性,并获得理想粒径的纳米微乳,所以在工业生产中应用最为广泛。一般需进行两步乳化:第一步,用高速混合器制得粗乳;第二步,用高压均质机乳化。乳化前冷却粗乳十分必要,因为高压均质机对粗乳的进一步分散会使温度升高。除高压均质机外,近年一些新型的设备,如微射流器、纳米机、用于实验室研究的微型挤压器等也被用于制备纳米微乳。这些设备使用方便快捷,并可根据需要调整工艺条件,以满足对制剂粒径大小的要求。

2.2 低能乳化法

低能乳化法是利用在乳化作用过程中曲率和相转变发生的原理,使乳滴的分散能够自发产生。这种方法减轻了制备过程对药物的物理破坏,通过自发机制可以形成更小粒径的乳滴。

2.2.1 相变温度(Phase inversion temperature, PIT)法 相变温度法是研究在某温度下,表面活性剂、助表面活性剂及相应的油相形成纳米微乳的相行为以及温度对其相行为的影响。利用聚氧乙烯型非离子表面活性剂的溶解度随温度变化而变化的特性,将水相和油相一次性混合在一起,当温度升高时,表面活性剂分子上的氢键脱落,聚氧乙烯链脱水,分子疏水性增强,自发曲率变成负值,形成水性反胶束(W/O型乳剂);当温度降低到相变温度时,表面活性剂自发地使曲率接近于零,并形成层状结构;温度再降时,表面活性剂的单分子层产生很大的正向曲率,形成细微的油性胶束(O/W型乳剂),这种变相时的温度即为PIT。PIT乳化法充分利用表面活性剂分子在相变温度时非常低的界面张力来促进乳化,故温度是最重要的影响因素,另外,盐浓度、pH也会对乳化产生影响。

2.2.2 相转变(Phase inversion composition, PIC)法 相转变法即转相法,是将水相连续加入油相中,在乳剂相转化点,表面活性剂形成层状结构,此时表面张力最小,有助于形成非常小的分散乳滴;在乳剂相转化点过后,随着水相的进一步增加,O/W型乳剂形成,即相转变中的液滴形成。相转变法需要短链表面活性剂,因为它在油水界面可形成弯曲的单分子层,导致在相变点形成纳米微乳,此转变过程又叫突发相转变。在这个转变过程中,表面

活性剂产生最小表面张力,这有助于乳滴的成形。

2.3 自动乳化法

自动乳化是指将油相(油、脂溶性的表面活性剂或能溶于水的溶剂)和水相(水、亲水的表面活性剂)混合,形成纳米微乳。自动乳化法制备纳米微乳的步骤为:制备油相(将油和油溶性表面活性剂溶解在可与水混溶的溶剂中,如丙酮),在磁力搅拌下,将油相加入水相中,与水混溶的溶剂通过减压蒸馏挥干。但自发乳化法要求油的含量低(一般是1%)。

当油相和水相的混溶性较好时,自动乳化的速率即达到最大。油的黏度、表面活性剂的亲油亲水平衡值(Hydrophile lipophile balance,HLB)和油相与水相的混溶性等是决定自动乳化法制备纳米微乳质量的重要因素。乳化过程的自发性则与表面活性剂的浓度和结构、油水界面黏度、界面张力、乳剂相转变区域和体积黏度等因素有关^[5]。

3 纳米微乳在复合维生素上的应用

维生素是畜禽机体代谢中不可缺少的物质,影响到动物健康和生长发育以及生产性能。虽然动物对维生素的需要量很少,但常由于饲料中供给不足、消化吸收不好、特殊生理和疾病等原因而造成动物的维生素缺乏症。目前复合维生素预混料和电解多维在养殖业中应用最普遍,但由于复合维生素预混料易受到饲料加工过程的影响降低活性。而电解多维多是固体形态,溶解后浑浊,易发生沉淀,堵塞水龙头。另外,复合维生素预混料和电解多维添加量大,吸收率低,其中脂溶性维生素的吸收率只有30%左右。

以纳米技术研制开发的纳米微乳复合维生素,使维生素的分子微团重新排列成纳米级,不仅可提高难溶性药物的溶解度,稳定性好,黏度低,粒径小,分散均匀,还可促进药物在体内的吸收,提高其生物利用度,弥补了传统工艺生产的复合维生素预混料和电解多维添加量大、吸收率低等缺点。

3.1 纳米微乳维生素的优点

3.1.1 稳定性好 维生素大多性质不稳定,在贮存过程中极易分解或被氧化。Izquierdo等^[6]研究表明,纳米微乳剂具有非常高的动力学稳定性。纳米微乳维生素由于采用了先进的界面工艺,充分利用了维生素间不同的表面张力,瞬间纳米级超

微粉碎,并在分子水平上瞬间进行生物膜深层次包埋,使不同酸碱度、不同热敏度、不同光敏度和不同氧化还原程度的维生素及其它营养物质共处同一非连续相的液体中,彼此稳定而互不干扰,很好地解决了由于环境因子不稳定而使维生素效价降低的问题^[7]。曹金党等^[8]通过试验证明,纳米微乳复合维生素在避光条件下保存一年后,各项指标经检测均无明显变化。

3.1.2 分散均匀 由于纳米微乳平均粒径在100 nm以下,纳米化处理使维生素颗粒表面的原子数越来越多,引起维生素颗粒表面电子构像和电子能谱的变化,从而使脂溶性维生素如A、D、E、K由高度疏水变为高度亲水,进而极大地改善了脂溶性维生素在水中的溶解性、分散性和透析性能^[9]。张文娟等^[10]通过试验制备了纳米微乳复合维生素并对其质量评价,结果显示其所制备的纳米微乳复合维生素外观黄色、透明、粘度低、流动性好;通过电镜观察可以发现纳米微乳复合维生素颗粒呈球形,分布均匀,粒径大小平均值为29.8 nm,均在1~100 nm范围之内。

3.1.3 吸收率及生物利用度高 普通的脂溶性维生素的吸收需先经胆汁的溶解才能通过非载体介导的被动扩散,进入肠黏膜细胞,而且还受胃肠道生理状态的影响,比如胆汁的分泌、采食和饲料内脂肪含量,所以一般平均吸收率仅为30%~35%。生物利用度约为50%。而纳米级维生素中脂溶性维生素是亲水性的,又处在胶体分散状态,因而是一种热力学稳定体系。另外,20~25 nm的脂溶性维生素,改善了脂溶性维生素在畜禽体内的药物动力学特性,在胃肠中释放后会与肠壁迅速接触并进入肠道黏膜细胞,2h便可被吸收,不需胆汁参与,吸收率100%,生物利用度在98%左右。在畜禽生产中,即使动物患有肝脏疾病或有脂肪吸收障碍,脂溶性维生素的吸收也不会受到影响,这对提升患病畜禽的体质、缩短疗程有非常积极的意义。另外,幼龄动物肠道发育不完善,胆汁分泌不足,纳米微乳维生素的运用改善了幼龄动物对脂溶性维生素的吸收利用率低的状况。

水溶性维生素的吸收是通过易化扩散、被动转运以及钠泵的主动转运而进入小肠黏膜的,而钠泵的主动转运,也只有当水溶性维生素的浓度

高时才起作用,所以水溶性维生素的粒度大小、溶解程度和胃肠道的有效接触面是氨基酸和水溶性维生素吸收的关键。而纳米微乳复合维生素以其独特的表面效应、界面效应和小尺寸效应可加大水溶性维生素与胃肠道细胞的有效接触面,从而提高其吸收率和生物利用度。

3.2 纳米微乳维生素在畜禽生产上的应用研究

维生素作为一种必需营养素对畜禽的肉品质、生产性能、免疫机能及繁殖功能具有重要的调节作用。以纳米技术研制的纳米微乳维生素因其具备明显的优势,近几年也得到了广泛关注和研究,并且逐渐运用到畜禽生产中。

3.2.1 生产性能 动物的生产性能涉及到动物营养与健康等多个方面,维生素虽不参与动物的能量供应和细胞组成,但在缺乏的情况下会引起多种代谢疾病,影响动物生产力。一般日粮中添加维生素可以降低料重比,降低死淘率,对家禽的屠宰净膛率有提高功效。通过纳米技术加工的复合维生素,不仅显著提高了动物对维生素的吸收和利用率,并确保了各营养成分的相互平衡和效率最大化,也避免了维生素成分的相互拮抗。

王海洲等^[11]报道纳米微乳维生素可以提高肉仔鸡平均日增重、平均日采食量和降低料重比;陈鹏举等^[12]在纳米微乳维生素对肉鸭生长性能的试验中也得到了相一致的结果,并得出添加量为0.4 mL/kg时效果最好的结论。裴小萍等^[13]研究结果表明试验组改善肉仔鸡平均日增重及饲料利用率,还显著提高了胴体品质。

在蛋鸡生产方面,由于蛋鸡产蛋高峰期后,生殖器官开始退化。例如卵泡发育减缓,输卵管开始老化、质脆,黏膜分泌功能逐渐变弱,容易引起输卵管炎症、产蛋率下降、蛋壳颜色陈旧、蛋清稀薄如水、残蛋率上升等。陈鹏举等^[14]通过试验表明,在蛋鸡饮水中添加复方维生素纳米微乳,可以提高蛋鸡后期的生产性能和改善蛋品质,进一步提高家禽行业的经济效益。党晓鹏等^[15]在试验中添加含量相同的普通维生素D3和纳米维生素D3,结果表明纳米维生素D3可明显提高蛋鸡产蛋率和蛋壳强度,显著降低破蛋率和鸡群死淘率,由此说明纳米维生素D3的吸收利用率明显高于普通维生素D3。

李建新等^[16]在奶牛的基础日粮中添加纳米微

乳复合维生素氨基酸显著提高奶牛产奶量,表明了维生素纳米技术在反刍动物中也有很广阔的应用前景。

3.2.2 免疫性能 在畜牧业生产中,除了畜禽的生长情况外,发病率和死亡率也是影响动物生产性能的因素之一。刘宗柱等^[17]的试验表明,纳米微乳复合维生素除了提高动物的生长速度,改善饲料转化率之外,还可以有效提高肉鸡成活率、降低药物使用成本。

免疫功能的高低取决于免疫器官的状况,比如胸腺和法氏囊是家禽的中枢免疫器官,在淋巴细胞的形成、诱导、分化过程中起着重要作用,且影响机体的细胞免疫和体液免疫功能;脾脏既是畜禽的外周免疫器官,也是淋巴细胞定居和对抗原刺激进行免疫应答的场所。王海洲等^[11]的试验表明,在基础日粮中添加纳米微乳维生素可以提高免疫器官指数,延缓胸腺和法氏囊的退化。张文娟等^[18]报道了纳米微乳维生素可提高肉仔鸡的胸腺、肾脏、法氏囊、脾脏、肝脏等免疫器官指数,对T淋巴细胞的分裂增殖作用明显。

3.2.3 繁殖性能 维生素与畜禽的繁殖性能密切相关,如维生素A可以促进精子和卵子产生、胎盘发育和胎儿生长,还可以维护妊娠母猪上皮组织的发育和促进分泌特殊的子宫蛋白;维生素E能使垂体前叶促性腺激素分泌增加,调节性机能,提高卵巢机能,增加卵泡黄体细胞,从而增强动物的繁殖性能。当畜禽缺乏维生素E时,精细胞的形成受阻,精液品质不佳,正常精子数减少,易发生不育;母畜受胎率下降,易产死胎或弱胎。

纳米微乳维生素可以显著改善畜禽的繁殖性能。如郭建斌等^[19]在母猪日粮中添加纳米微乳复合维生素,结果显示试验组能显著提高母猪发情率,缩短断奶后发情天数;也显著提高了窝产仔数、初生窝重、断奶仔猪重以及断奶成活率。

4 结语

目前,国内纳米微乳方面的研究虽已兴起,但仍处于起步阶段。复方维生素纳米微乳其稳定性好、较高的吸收率和生物利用度。能够有效改善和提高畜禽的生产性能、免疫性能和繁殖性能,在畜禽生产上的应用优势明显,前景广阔。

参考文献:

- [1] Shinoda K, Kunieda H, Prince L M. Microemulsions: Theory and Practice[M]. Academic Press, New York, 1977.
- [2] Shinoda K, Araki M, Sadaghiani A, et al. Lecithin-based microemulsions: phase behavior and microstructure [J]. The Journal of Physical Chemistry, 1991, 95(2): 989-993.
- [3] Overbeek J T G. The First Rideal Lecture. Microemulsions, a field at the border between lyophobic and lyophilic colloids [J]. Faraday Discussions of the Chemical Society, 1978, 65: 7-19.
- [4] 苏德森, 王思玲. 物理药剂学[M]. 北京: 化学工业出版社: 2004. 338-361.
- [5] Bouchemal K, Brian on S, Perrier E, et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation [J]. International journal of pharmaceuticals, 2004, 280(1): 241-251.
- [6] Izquierdo P, Feng J, Esquena J, et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method [J]. Journal of colloid and interface science, 2005, 285(1): 388-394.
- [7] 赵成萍, 田野. 纳米级维生素的研究 [J]. 饲料工业, 2006, 27(6): 62-64.
- [8] 曹金党, 李广, 先秀, 等. 畜禽用纳米微乳复合维生素稳定性试验的研究 [J]. 家禽科学, 2010(9): 41-43.
- [9] 陈鹏举, 韩斐, 王菲菲, 等. 复方维生素纳米乳口服液的生产工艺及其优势 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2014(12): 26-27.
- [10] 张文娟, 欧阳五庆, 王金虎. 复合维生素纳米乳的制备及其质量评价 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3): 388-392.
- [11] 王海洲, 丁永贵, 张黎鑫. 纳米微乳维生素饲喂肉鸡效果试验 [J]. 山东畜牧兽医, 2013, 34(9): 3-5.
- [12] 陈鹏举, 蔡珍珍, 王菲菲, 等. 复方维生素纳米乳促进樱桃谷肉鸭生长性能的效果研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(11): 105-107.
- [13] 裴小萍, 郭晓红, 杨光. 液体纳米维生素对肉仔鸡生产性能和胴体品质的影响 [J]. 畜牧与饲料科学, 2011(12): 52-54.
- [14] 陈鹏举, 韩斐, 孙秉利, 等. 复方维生素纳米乳对蛋鸡后期生产性能、蛋品质的影响 [J]. 中兽医学杂志, 2015(9): 21-22.
- [15] 党晓鹏, 黄新活, 杨涛, 等. 纳米维生素 D3 对蛋鸡生产性能的影响 [J]. 今日畜牧兽医, 2014(10): 38-41.
- [16] 李建新, 张晓娜, 张卢军, 等. 纳米级液体复合维生素氨基酸对奶牛产奶量的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(6): 52.
- [17] 刘宗柱, 曹金党, 房日国, 等. 复合维生素纳米微乳对商品肉鸡成活率和生产性能的影响 [J]. 养禽与禽病防治, 2011(4): 4-7.
- [18] 张文娟, 欧阳五庆, 胡帅, 等. 复合维生素纳米乳对肉仔鸡生产性能和免疫力的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(6): 61-66.
- [19] 郭建兵, 张成叶, 席淑云, 等. 液体纳米维生素对母猪繁殖性能的影响 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2015(8): 223-224.

《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)

(1976 年创刊, 大 16 开本, 正文 52 页)

ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

主管单位: 广东省农业科学院

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

订 价: 每期定价 10 元, 全年 60.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过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一号 103 室 《广东畜牧兽医科技》编辑部 (邮编: 510640)

电 话: 020-61368881 E-mail: gdxmsykJ@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低的原因分析及可行性解决方案

李 龙

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

摘 要: 肉种鸡种蛋孵化生产过程中普遍存在着正常受精率条件下, 但是孵化率低的现象。本文从管理、营养、遗传和免疫四个方面总结了正常受精率条件下种蛋孵化率低的原因, 并提出正常受精率条件下种蛋孵化率低的问题排查路径与解决方案。为在正常受精率情况下, 稳定并提高肉种鸡孵化率和科学查找孵化率低的原因提供思路和可操作的相应措施。

关键词: 肉种鸡; 受精率正常; 孵化率低; 原因; 方案

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0011-04

在生产中, 经常出现肉种鸡受精率正常但是种蛋孵化率低这一令人头疼的问题。研究表明在孵化率低下的原因中, 42%被归因于受精率问题, 28%被归因于胚胎早期死亡, 24%则是由于胚胎晚期死亡^[1]。如果肉种鸡受精率正常, 那么种蛋孵化率低下的主要原因就是胚胎早期死亡或者胚胎晚期死亡。所以在肉种鸡人工受精后检测受精率正常后, 了解种蛋产生孵化率低的原因, 做出相应的预防措施, 并适时监控整个孵化过程是减少孵化率低的根本途径。本文论述几种在受精率正常条件下但是种蛋孵化率低原因和特点, 提出对应的预防方案, 望能对广大种鸡场朋友有所帮助。

我们知道种鸡种蛋孵化过程主要分为消毒、贮存、种蛋处理(分级码盘)、孵化、落盘、出雏(见表1), 所以在这个过程中每个环节的因素加上种蛋自身的原因都可能造成孵化率低的问题。

1 肉种鸡正常受精率条件下孵化率低的原因分类

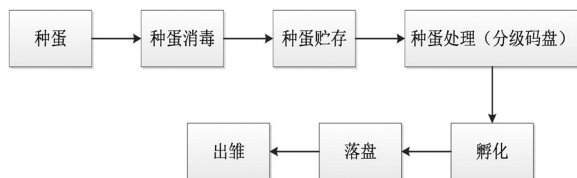


图1 种蛋孵化过程

基于对肉种鸡种蛋孵化过程中所有影响种蛋孵化因素的考虑, 在正常受精率条件下, 孵化率低的原因大致可以分为对种鸡和种蛋的管理因素和种蛋自身因素2个类型。下面就孵化率低的不同类型简述其原因和特点。

1.1 管理因素造成的肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低的原因

影响孵化率管理因素主要包括种蛋管理、孵化过程的管理等^[2-7](如表1所示)。

1.2 种鸡营养因素造成的黄羽肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低

种鸡营养因素造成种蛋正常受精率条件下孵化率低的原因很多, 主要是因为种蛋里面的营养素和非营养素在种蛋的沉积, 从而影响了种蛋的孵化; 这其中主要包括维生素^[8,9]、微量元素^[8,10]、饲料中的霉菌毒素^[11]、饲料中所用饲料原料含有的抗营养因子^[12-14]、饲料中的共轭亚油酸^[15]等在种蛋中的沉积, 从而影响胚胎发育和孵化率(表2)。

1.3 种鸡遗传因素造成的黄羽肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低的原因

种鸡遗传因素也可能造成的种蛋在受精率正常情况下孵化率低, 其主要原因是近交种蛋导致的孵化率低, 因为鸡的致死基因可导致孵化末期的胚胎死亡^[16]。

收稿日期: 2016-12-01

作者简介: 李 龙(1985-), 男, 博士研究生, 助理研究员, 从事黄鸡营养与饲料研究。E-mail: leeloong1985@sina.com

表 1 管理因素造成的正常受精率条件下孵化率低

影响孵化率的管理因素	出现问题的可能环节	出现问题的原因	主要发生阶段
种蛋管理	种蛋消毒	脏蛋多(即使擦干净污秽,细菌和其它微生物也进入了蛋内)	1-7 天
		消毒时间延迟(30 分钟之后)	1-7 天
		消毒方法使用不当(如熏蒸剂量和熏蒸的时间不对)	1-7 天
	种蛋贮存	贮存时间过长(超过 7 天)	1-7 天
		贮存温度湿度不当	1-7 天
种蛋处理	转蛋不当:如在孵化的前两周,未能按时转蛋或转蛋次数、角度不够,会发现雏与内壳膜粘连,造成残翅或其他畸形。	1-7 天	
孵化过程管理	温度	孵化温度过高过低影响胚胎发育,造成胚胎死亡。	1-7 天
	湿度	孵化湿度过高过低影响蛋内水分代谢,胚胎死亡率高。	1-7 天
	翻蛋	孵化中翻蛋不当或完全停止翻蛋,卵黄容易粘附于蛋壳膜上,影响胚胎运动,造成胎位不正,导致胚胎死亡。	1-7 天
	通风	孵化中通风不良,出现胎位不正和畸形,胚胎死亡率增高。	1-7 天
	供电	由于电压不稳或者停电,孵化器出现故障,造成温度降低和机内温度不均匀,使胚胎发育受阻甚至死亡。	1-7 天

表 2 营养因素造成的正常受精率条件下孵化率低

影响孵化率的营养因素	出现问题的环节	出现问题的原因,结果和症状	
维生素 A	种鸡采食的饲料	种蛋缺乏维生素 A,导致胚胎 1-6 天死亡,死胚眼肿、肾脏有尿酸盐沉积。	
维生素 B2	种鸡采食的饲料	种蛋缺乏维生素 B2,,胚胎发育不全,水肿,羽毛发育受阻,呈结节状绒毛,导致胚胎 9-14 天死亡。	
维生素 B1	种鸡采食的饲料	种蛋缺乏维生素 B1,19-21 天胚胎死亡。	
生物素	种鸡采食的饲料	胚胎死亡高峰在第 1 周和最后 2 天,死胎发育迟缓、骨骼弯曲、鸚喙嘴、球形头、腹外突、体形小、翅腿短粗、羽毛发育停滞。	
泛酸	种鸡采食的饲料	种蛋缺乏泛酸,导致胚胎死亡高,多在最后几天,胚胎皮下出血、水肿。	
维生素 B12	种鸡采食的饲料	种蛋缺乏维生素 B12,,胚胎后期因畸形而死亡,也有报道孵化一周内胚胎死亡。	
维生素 D3	种鸡采食的饲料	缺乏维生素 D,导致蛋壳疏松度变化,尿囊发育迟缓,死胚皮肤水肿、肝脏脂肪浸润、肾脏肥大 7-12 天死亡出现死亡高峰。	
维生素 E	种鸡采食的饲料	缺乏维生素 E,1-3 天胚胎早期死亡。	
微量元素	钙、磷	钙磷不足时蛋壳质量差,蛋在孵化前和孵化期水分损失过多,失重明显,孵化第 1 周内死亡率增加,另外还伴有胚胎生长阻滞,骨骼发育不良,孵化末期死亡率也升高以及污染的可能性加大等。	
	锌	种鸡采食的饲料	胚胎骨骼发育受阻,羽毛发育不良,有些鸡胚还有无尾畸形,18-21 天出现死亡高峰。
	锰	种鸡采食的饲料	头喙异常,18-21 天出现死亡高峰。
饲料霉变	种鸡采食饲料	饲料在种鸡体内沉积的霉菌毒素转移到了种蛋中,在胚胎发育过程中影响鸡胚发育。	
饲料中的抗营养因子较多	种鸡采食饲料	如棉粕中的棉酚和菜粕中的硫葡萄糖甙在种蛋中沉积导致鸡胚发育异常,甚至死亡。	
饲料中共轭亚油酸不足	种鸡采食饲料	共轭亚油酸缺乏引起脂肪酸组成变化,导致蛋黄脂类生理性质变化,从而导致胚胎发育受阻甚至死亡	

1.4 肉种鸡免疫水平造成的黄羽肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低的原因

鸡群感染新城疫、传染性支气管炎、鸡白痢等疾病,并且种鸡体内免疫抗体水平较低,导致胚胎在发育过程中容易致死^[17]。

2 肉种鸡正常受精率条件下种蛋孵化率低的问题排查与解决方案

要解决肉种鸡种蛋受精率高、孵化率低的问题,必须做好事前预防,事后排查的工作。即在种鸡饲养、生产种蛋过程中要提前预防种鸡遗传因素、营养因素、免疫因素等造成的种蛋孵化率低(图2),同时也要加强孵化条件的管理^[18-22](图3);对于正在孵化的种蛋,其孵化过程中的各个环节要进行细致入微的监测,这主要通过照蛋来监测胚胎发育情况,从而判断可能发生的孵化率降低的情况^[23](见表3)。与此同时对于已经发生了的种蛋孵化率低的情况,要通过摸排管理因素和营养因素造成

的原因,通过其症状和死胚日龄初步判断可能原因,并且通过打开未孵化出壳蛋检查胎位情况从而确定原因后尽量减少损失(参照表1、表2)。

参考文献:

[1] 胡少昶, Lundeen T. 肉种鸡的受精率与雏鸡孵化率有关[J]. 国外畜牧学. 猪与禽, 2003(2):12.
 [2] 刘娟, 苏伟岳. 种蛋的选择、保存与消毒对孵化率的影响[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013(5):38-38.
 [3] 徐凤山, 杨宝江, 包淑玲, 等. 浅谈种蛋的选择消毒运输及保存[J]. 当代畜牧, 2013, 23:43.
 [4] Reis L H, Gama L T, Soares M C. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights[J]. Poultry Science, 1997, 76(11):1459-1466.
 [5] 王志强, 李国兵. 贮存时间对不同日龄种鸡所产种蛋孵化效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010(22):70-72.
 [6] 郭均. 肉用种鸡种蛋的孵化温度[J]. 山东家禽, 2002(7):8.
 [7] Brake J T, 唐顺发. 影响肉种鸡蛋孵化率的一些重要因素[J]. 国外畜牧科技, 1996(3):34-36.

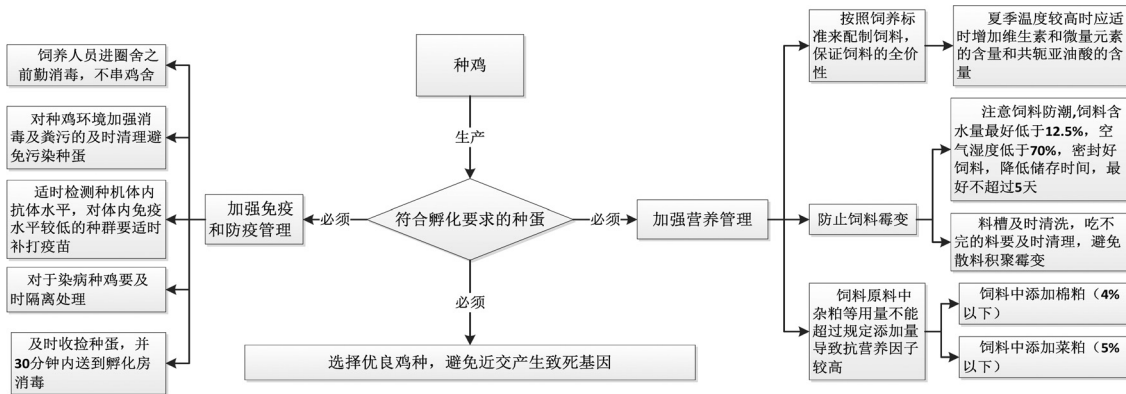


图2 肉种鸡饲养过程对种蛋孵化率低预防措施

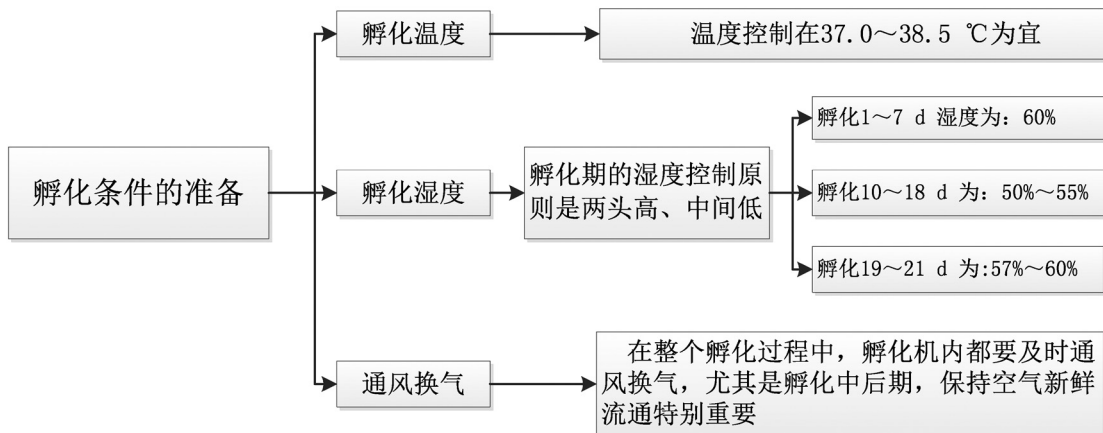


图3 孵化条件的管理

表 3 孵化情况监测表(照蛋和孵化出壳情况)

	现象	查找原因	解决方案和操作方法
孵 化 5 天 头 照	血管充血	孵化温度较高	调低温度 → 调试孵化温度达到 37.0-38.5℃
	气室大、出现血线、血环,有黏于蛋壳上、散黄多	贮存时间长	及时孵化 → 16-17℃条件下贮存不超过 7 天
	散黄蛋多、气室可动、细带断裂多	种蛋受到剧烈震动 冬季种蛋受冻	在收集种蛋、入孵消毒、转蛋和落盘时轻柔轻放 加强保温,在收集种蛋、入孵消毒之前注意保温,孵化室温度要保持在 20-25℃
孵 化 11 天 时 二 照	尿囊血管提前合拢	孵化室内温度过高	孵化室温度要保持在 20-25℃
	尿囊血管未合拢,小头尿囊血管部分破裂	整个孵化期温度过高	注意适当调低孵化温度,孵化温度达到 37.0-38.5℃
	尿囊血管未合拢,但不充血	温度过低	调试孵化温度,使其温度升高,孵化温度达到 37.0-38.5℃
		通风不良	加强孵化机里新鲜空气的流通
翻蛋异常		翻蛋角度和次数要符合要求	
营养缺乏	保证种鸡饲料营养全价性,加强维生素、矿物质和共轭亚油酸营养		
孵蛋破裂,散发出恶臭	种蛋污秽或孵化环境污染	及时收蛋,以免散落饲料和粪便污染,并且及时清理孵化过程中的死胚蛋	
孵 化 17 天 时 三 照	封门提前或延迟	温度偏高或者温度偏低	调节孵化温度,孵化温度要达到 37.0-38.5℃范围,根据实际情况降低或升高孵化温度
		温度偏低或者偏高	调节孵化温度,孵化温度要达到 37.0-38.5℃范围,根据实际情况升高或降低孵化温度
	不封门	翻蛋异常	翻蛋角度和次数要符合要求
		通风不良	加强孵化机里新鲜空气的流通
		营养缺乏	保证种鸡饲料营养全价性,加强维生素、微量元素营养和共轭亚油酸营养
出 壳 的 不 一 致 性	种蛋孵化出壳不一致性	种蛋的贮存时间长短不一	种蛋必须选择同时贮存的种蛋入孵
		种蛋源于不同鸡群	应选择同一鸡群的种蛋入孵

(下转第 28 页)

影响肉鸡后肠蛋白质发酵的日粮因素

张露露¹, 王东升²

(1. 北京中农榜样蛋鸡育种有限责任公司, 北京 102101;

2. 上海光明荷斯坦牧业有限公司, 上海 200436)

摘要: 现代肉鸡的高效生长需要日粮提供大量的可消化蛋白质和能量。除了提高日粮转化效率, 还需阻止过剩的未消化日粮蛋白质进入后肠被微生物发酵。后者会产生大量的蛋白质衍生物, 包括氨、胺、吲哚类和酚类化合物, 以及次级产物(乳酸和琥珀酸)和甲烷、氢和二氧化碳等。研究表明, 蛋白质在禽类回肠和盲肠食糜中发酵产生生物胺和支链脂肪酸(BCFA)。含氮废物(由微生物发酵产生)的代谢产物如尿酸和氨会增加机体负担并产生额外的能量消耗, 高浓度的生物胺会导致肉鸡肌胃糜烂甚至造成死亡, 降低生长率。降低不可消化蛋白质会减少后肠道蛋白质的发酵, 在肉鸡料中添加粗粉原料(直径在600~900 μm)或者添加益生元、益生菌和有机酸, 尤其是丁酸可增加蛋白质的消化率, 减少后肠道蛋白质的发酵。

关键词: 肠道健康; 蛋白质发酵; 后肠道; 肉鸡; 饲养方式; 有机酸

中图分类号: S852.23

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0015-07

肉鸡具有高采食、高蛋白质沉积的能力^[1], 生长期越来越短, 在5周内饲喂3 kg饲料肉鸡可增重2 kg^[2]。如此快速的生长速率主要是过去10年遗传选择的结果。高生长率需要具有高浓度的可消化蛋白和能量的饲料。在实际的饲料配方中, 高可消化蛋白质可能包含一定量的不可消化蛋白质。后者进入后肠道可以作为后肠微生物的发酵底物^[3]。这些未消化的蛋白质和内源性蛋白质可促进肠道微生物的增殖, 尤其是当可用于发酵的碳水化合物不足时, 这种作用尤为突出。在理想的环境中, 未吸收食糜和内源氨基酸在大肠中将为微生物蛋白质的合成提供骨架, 此过程需要食糜中的碳水化合物提供能量。后肠蛋白质发酵的程度往往取决于可利用蛋白质和可用于发酵的碳水化合物的量, 这是因为碳水化合物是肠道微生物能量的主要来源。

蛋白质分解是蛋白质被肠道微生物利用的第一步^[3], 之后的氨基酸脱氨和脱羧释放的底物可作为能量的来源。禽类的盲肠是发酵的主要场所, 它为肠道固有的微生物群提供稳定的生长环境^[4]。另外, 利用饲料和内源氨基酸作为能量和蛋白质的合成过程中, 肠道微生物可以利用未消化的氮产生腐败化合物包括吲哚、酚类、含硫化合物、氨和胺, 同时还会产生一些有益的产物如挥发性脂肪酸(VFA)和支链脂肪酸(BCFA), 还有一些次级代谢

产物(乳酸盐、琥珀酸盐)以及几种气体产物(甲烷、氢、硫化氢和二氧化碳)。

蛋白质发酵对肉鸡生长性能和肠道健康具有重要影响。由于高度易消化的蛋白质原料价格不断上涨, 寻找低成本的蛋白质原料渐渐成为一种趋势。本文综述了后肠蛋白质发酵的发生及其对肉鸡生长性能的影响, 并分析了通过应用大量营养方法降低肉鸡后肠蛋白质发酵的可行性。

1 蛋白质在肉鸡肠道中的发酵

发酵是有机物在胃肠道中被微生物降解的过程。碳水化合物的发酵被认为是有益的, 其产生挥发性脂肪酸可为机体提供能量^[5]; 而蛋白质的发酵通常被认为对机体健康有害, 其发酵的产物通常是一些有毒化合物如氨和胺类物质, 降低禽类的生长性能。有研究发现, 乳酸盐、氨和短链脂肪酸在饲用肉鸡的谷物中出现, 表明饲料混合物的发酵在谷物中就可以发生; 在禽类中, 由于食糜在十二指肠停留的时间短, 肠道pH值低, 因此微生物的活性比较低, 短链脂肪酸的浓度较低(2~12 μmol/g食糜), 甚至较难检出。在盲肠, 细菌的发酵活性较高, 主要是因为食糜停留时间较长, 微生物浓度较高^[5]。目前还没有发现肉鸡后肠蛋白质发酵的发生机制及其重要性的相关研究文献。

1.1 肠道微生物群

肠道微生物生态系统是复杂的, 由真菌、原虫

和大部分细菌组成。近年,随着微生物分析技术的发展,人们所知的禽肠道细菌种类已经由过去的200种上升到640多种。肠道不同部位的微生物多样性反映出肠道中不同部位微生物种群对底物的不同需求^[6]。肉鸡孵化后第1天,来自回肠的每克食糜中含有大约 10^8 个细菌,3日龄时将增加到 10^9 个,随后保持这个浓度直到30日龄^[7]。乳酸菌是回肠中主要的菌类,约占70%,其他菌种包括梭菌(11%)、链球菌(6.5%)和肠球菌(6.5%)^[8]。

这些菌群受到饲料成分的影响,中链脂肪酸会阻碍革兰氏阳性菌厚壁菌门和其他菌类包括乳酸杆菌、微球菌和肠球菌的生长,但促进革兰氏阴性菌的生长。这说明了在微生物菌群中革兰氏阳性菌比革兰氏阴性菌对增加饲料中链脂肪酸的浓度较敏感。盲肠中微生物种群的多样性远远高于回肠,梭状芽胞杆菌(瘤胃球菌、真杆菌)是主要菌群^[9]。在肉鸡盲肠中,微生物菌群浓度最终可达到 10^{11} 个/g食糜,主要为专性厌氧菌。肉鸡孵化后的最初几天,粪肠球菌是回肠的优势菌群,而随着肉鸡的生长,专性厌氧菌逐渐成为优势菌群;在14日龄时,肉鸡回肠中厌氧菌主要由革兰氏阳性菌(梭菌属、真杆菌属、乳杆菌、厌氧球菌)和革兰氏阴性菌(类杆菌属、梭杆菌属、芽孢球菌属)组成;40日龄后,肠道微生物菌群会达到一个稳定的状态,这个阶段主要由革兰氏阳性菌组成,包括双歧杆菌属、梭菌属、链球菌属、大肠杆菌、拟杆菌和乳酸杆菌。

1.2 回肠和粪便消化率的差异

氮在后肠中的代谢包括日粮蛋白质、内源蛋白质、微生物源蛋白质和其他含氮化合物的分解与合成。由于蛋白质在大肠中被降解成不同的化合物(生物胺、氨、吲哚、酚、甲酚和粪臭素)导致日粮氨基酸在排泄物中减少,从而导致高估氨基酸的消化率。相反,当氨基酸的消化率被低估时,会导致后肠微生物氨基酸合成增加。在比较饲喂肉鸡不同饲料组成回肠和排泄物中氨基酸消化率的试验中,测定回肠和排泄物中的氨基酸,并没有发现内源氨基酸(除了天冬氨酸和谷氨酸)的损失^[10]。因此,大肠在整个肠道内源氨基酸损失中并没有明显作用。因为在后肠中氨基酸吸收不显著^[11],那么回肠和排泄物氨基酸消化率对于预测蛋白质发酵的发生起到重要作用。如果没有蛋白质发酵发生,消化率(测定回肠食糜)与排泄物的表现和标准消化率差异均不显著。不同的饲料原料氨基酸在肉鸡回肠和排泄物中

的消化率差异显著。一些研究表明,排泄物中氨基酸和总氮回收率与回肠食糜相比降低,也有学者研究表明,在排泄物中氨基酸的回收率升高^[10]。

大多数氨基酸会出现负值,有些原料如小麦变异很大。氨基酸值为正(缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和丙氨酸)表明这些氨基酸在禽类后肠净合成。而氨基酸为负值(苏氨酸、亮氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、脯氨酸和酪氨酸)表明这些氨基酸在禽类大肠中被分解。

2 后肠蛋白质发酵的代谢产物

蛋白质在后肠中发酵的最终产物如生物胺、BCFA、氨、苯酚、吲哚、甲酚、粪臭素和硫化氢(H_2S),通常对宿主本身有害。

2.1 生物胺

胺在肠道微生物如拟杆菌、梭状芽胞杆菌、双歧杆菌、肠细菌和链球菌属的作用下由氨基酸脱羧基产生。胺可由有机体形成生物胺,包括一元胺(酪胺)和多胺尸胺、腐胺和精胺^[12]。组氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和精氨酸经发酵分别产生组胺或亚精胺、腐胺和亚精胺、尸胺、亚精胺、酪胺、苯乙胺、色胺或五羟色胺以及丁胺或腐胺和亚精胺。多胺和亚精胺主要由组氨酸、鸟氨酸、甲硫氨酸和精氨酸代谢产生,亚精胺最终转变成精胺,多胺以及腐胺、亚精胺、精胺是有益的蛋白质代谢产物,它们有利于小鼠肠粘膜细胞的修复。目前仍缺乏有力数据证明生物胺在禽类中的生理学作用。

在日粮中添加合成生物胺会显著降低肉鸡的生长并增加死亡率。Shifrine等(1960)在日粮中分别添加0.25%、0.50%和1.0%组胺,发现肉鸡生长性能降低,腺胃肿大。Fossum等^[13]研究表明,肉鸡饲料中添加2.2 mg/kg组胺会导致肌胃糜烂,死亡率高并降低生长速率。相反,日粮中添加0.2%、0.4%腐胺时,与正常日粮组相比,会显著增加肉鸡的生长速率,改善饲料转化率,但当腐胺添加量超过0.4%时,会降低采食量以及饲料转化率。同样,Barnes等^[14]研究发现在肉鸡饲料中额外添加0.1%、0.2%组胺时,体增重分别降低6.2%和9.2%。后续研究发现,日粮中添加组胺会造成饲料转化率的降低,肌胃病变肿大。Tiisonen等(2010)研究精油对肉鸡生长性能及肠道微生物的影响,与正常日粮组相比,20日龄时回肠生物胺(色胺、

腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺)浓度较高,死亡率增加。相反,在40日龄时盲肠生物胺(甲胺、色胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺)浓度较高,体增重明显增加。另外,回肠食糜生物胺的总浓度与体增重之间的反比关系也发生在41日龄时。Tiihonen等(2010)研究表明,盲肠较回肠总生物胺浓度要高,同样微生物蛋白质分解活性也较高。这可能是因为食糜在盲肠停留的时间较长或者盲肠中具有更多的微生物群。同样,Rehman等(2008)研究发现饲喂玉米豆粕型日粮,肉鸡盲肠中生物胺(色胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺和精胺)的浓度较回肠高9.2%。研究者发现腐胺、尸胺和酪胺在回肠食糜中的浓度高于盲肠,通过盲肠样品获得大约较回肠高出4.4倍浓度的亚精胺。综上研究表明,鸟氨酸或精氨酸、赖氨酸和酪氨酸在回肠中发酵程度较高,而甲硫氨酸、组氨酸、鸟氨酸和精氨酸在盲肠中发酵程度较高。

2.2 支链脂肪酸

缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸在动物肠道中降解分别产生BCFAs 异丁酸酯、2-甲基丁酸和异戊酸,这些支链脂肪酸与碳水化合物发酵而来的直短链脂肪酸相比,具有刺鼻的气味。支链脂肪酸在后肠主要是由一些细菌包括杆菌属、丙酸菌、链球菌和梭状芽孢杆菌等产生的。正戊酸和BCFA出现在盲肠食糜中,而在谷物和鸡胃中并未检出,这表明蛋白质水解发酵主要发生在盲肠。Tiihonen等(2010)研究发现,在肉鸡41日龄时盲肠食糜中BCFA的浓度是回肠中的12.9倍。研究者发现异丁酸、异戊酸和2-甲基丁酸分别占总BCFA的50.7%、19.2%和20.1%,这表明缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸在盲肠中的发酵率高于回肠。Guo等^[5]在体外研究盲肠内容物发酵特性时发现,蘑菇与其多糖提取物相比,发酵后会产生更高水平的BCFA,完整的蘑菇具有更高的蛋白质含量。高浓度的BCFA表明对完整原料的蛋白质水解发酵能力要高于提取物^[15]。Faber等^[16]研究发现,饲喂肉鸡豆粕(SMB)时,肠道食糜中异丁酸酯、异戊酸、戊酸和总BCFA,与饲喂大豆分离蛋白(SPI)相比分别高出2.7、2.3、3.0、2.5倍。这些数据显示,高蛋白饲料在盲肠中具有较高的蛋白发酵水平。Meyer等^[17]研究发现,在蛋鸡日龄中添加5%的羽毛粉,与对照组相比具有较高的异丁酸异戊酸盲肠摩尔比,主要是因为羽毛粉为盲肠蛋白质发酵提供更

高浓度的蛋白质,而回肠中的浓度远远低于盲肠。同样,在另一项试验中,Meyer等^[18]研究发现在高低啄羽品种中,与回肠食糜相比,盲肠食糜中SCFA浓度高出约19%。研究者还发现,低啄羽品种比高啄羽品种盲肠异丁酸和异戊酸具有更高的摩尔比。最终代谢产物并未在回肠食糜中检测到。在盲肠中高浓度的BCFA(异戊酸和异丁酸)表明盲肠中微生物蛋白的代谢活性高于回肠。

2.3 氨

氨由氨基酸脱氨产生,是微生物发酵的有毒废物,可被禽类吸收并以尿酸的形式排泄,或者经过微生物转化为菌体蛋白。猪大肠中高浓度的氨可能反映出大量未消化的蛋白质进入后肠,对肠道上皮细胞的生长有副作用。氨可穿过肠壁并干扰肠粘膜生长,直观的表现是绒毛高度的降低。肠壁氨的吸收对肠上皮细胞有毒性作用。盲肠高浓度的氨导致盲肠pH值升高,为病原微生物提供良好环境,增加了肠炎的风险^[19]。Namroud等^[20]研究发现,由于降低肉鸡日粮蛋白水平,导致血氨水平以及排泄物的改变。他们发现,日粮蛋白水平从23%降低到17%,粪便中氨从50.3 mg/g降低到36.3 mg/g(以干物质计),粪便中尿酸含量从113.5 mg/g降低到101.1 mg/g(以干物质计)。与没有提供必需氨基酸的低蛋白日粮相比,低蛋白(17%)日粮组中额外添加10%的必需氨基酸(Lys、Thr、Arg以及Trp)导致血氨水平升高。氨水平与生长性能存在负相关,在小鼠以及狗上有报道。氨主要转化成尿酸,通过增强氨转化为尿酸,血液中高水平的氨可能会减少,而在禽类中转化每个分子的尿酸需要一摩尔的甘氨酸^[20]。这可能导致氨基酸的损失以及生产性能的降低。血液中高浓度的氨将导致粪便中出现更多的氨氮,因为这两者之间存在很强的相关性。与饲喂高蛋白(23%)日粮肉鸡组相比,添加必需氨基酸的低蛋白(17%)日粮肉鸡组中,较高浓度的血氨导致体重及采食量降低,饲料转化率变差以及肝脏重量升高^[20]。较低的体重及较高的肝脏重量可能是由于肝脏尿酸代谢增加。在哺乳动物中,尿素循环酶较高的活性抑制生长速度。Guo等^[5]在肉鸡盲肠内容物中采用蘑菇、药用植物及其多糖成分的体外发酵结果显示,与提取物组相比,完整物料组有更高的氨浓度,这是由于与提取物相比,含有更高的蛋白质以及更低的碳水化合物。进一步研究发现,盲肠内容物中支链脂肪酸(BCFA)与氨含量正相关。与

提取物相比,高水平氨揭示了完整物料中较高水平的蛋白质和低碳水化合物的发酵。日粮中含有较高水平未消化的蛋白质,特别是缺乏适宜碳水化合物发酵的情况下,可能会阻碍禽类最佳性能的发挥和肠道健康^[5]。Khemпка等^[21]评估日粮中添加1.07%、2.26%、3.34%、4.53%壳多糖(纯度为83.9%)以及4种不同浓度(5%、10%、15%、20%)虾粉对肉鸡生长性能、肠道菌群、VFA以及氨产量的影响。与回肠相比,饲喂15%虾粉的肉鸡盲肠内容物中氨浓度更高,说明在盲肠中蛋白质水解的活性更强。研究者还评估了血液尿素氮,发现与对照组相比,饲喂15%虾粉组为最低浓度,从而导致与其他组相比,其能提高肉鸡的生产性能。

2.4 酚、吡啶、甲酚和粪臭素

芳香族氨基酸的微生物发酵,比如苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸和酪氨酸,能产生酚和吡啶。这些化合物参与动物结肠的癌变,而酚通过硝酸参与仲氨的亚硝化,吡啶能加强亚硝化。芳香族氨基酸的有氧代谢能产生粪臭素、甲酚等产物以及其他酚类化合物。排泄物中特殊的气味主要来自粪臭素和甲基硫化物,而甲酚与有毒气体相关联。有研究报道在56日龄肉鸡盲肠中存在苯酚、对甲酚、吡啶和粪臭素,含量分别为64.9、64.1、43.8、5.5 $\mu\text{g/g}$ 湿内容物。随着日龄增加,盲肠内容物中这些成分的含量呈现降低的趋势,表明随着肉鸡日龄的增加,蛋白质消化能力增强;62日龄盲肠内容物中有酚、对甲酚、吡啶、粪臭素的存在(含量分别为32.7、91.3、8.1、13.9 $\mu\text{g/g}$ 湿内容物)。肉鸡盲肠中腐败成分的存在表明酪氨酸及色氨酸发酵的发生。这些成分的存在与盲肠中大量蛋白发酵菌群密切相关,比如梭状芽胞杆菌、拟杆菌和葡萄球菌属。

2.5 硫化氢

硫化氢是日粮、粘液性硫酸盐、含硫氨基酸发酵终产物的一种,通过硫酸盐还原菌形成,包括甲硫氨酸、半胱氨酸和牛磺酸等^[22]。硫化氢对于啮齿动物来说是剧毒物质,相当于氰化物。硫化氢对结肠细胞潜在的毒性作用包括通过阻碍丁酸的氧化破坏结肠细胞最重要的能量来源^[23]。含硫氨基酸比如Met以及Cys,是肉鸡粪便中硫元素的主要来源,与微生物发酵导致硫化氢的产生相关。Chavez等^[24]报道日粮中添加蛋氨酸钠盐的肉鸡排泄物中含有硫化氢、二甲基二硫化物和三甲基三硫化物,含量分别为224.4、11.5、3.6 ng/g 粪

便。饲喂玉米-豆粕型基础日粮(CP:21%)的对照组肉鸡排泄物中硫化氢、二甲基二硫化物和三甲基三硫化物含量分别为49.6、5.6、2.9 ng/g 粪便,可能表明氨基酸的分解代谢。同样,Chen等^[25]报道在35日龄肉鸡盲肠内容物中存在 H_2S (49 mg/L),表明 H_2S 是家禽蛋白质降解的代谢产物。 H_2S 对家禽的毒性作用可能不如对哺乳动物的,因为羽毛的产生需要更高的含硫氨基酸包括甲硫氨酸和半胱氨酸。这些氨基酸在大多数肉鸡日粮中含量有限并且在前肠吸收。

3 通过日粮因素的作用方式降低后肠蛋白质发酵

3.1 蛋白质来源及添加量

日粮蛋白质含量和其消化率影响来自后肠蛋白质发酵的微生物代谢产物的形成及数量。蛋白水解的微生物发酵与后肠蛋白及未消化日粮蛋白水平直接相关,其能增加胃肠道致病菌群的分裂。通常,家禽日粮中未消化氨基酸占整个日粮蛋白的比例为8%~35%^[26]。De Lange等^[27]报道,肉鸡日粮中增加不消化蛋白成分对饲料转化率(FCR)有负线性效应。作者发现,随着日粮中增加大约10 g/kg 不消化蛋白成分(从35.3 g/kg 到43.9 g/kg),FCR增加0.08,日粮中使用不同水平的豆粕、豌豆、水解羽毛粉和肉骨粉。在肉鸡日粮中添加适当水平的高消化率蛋白质有望减少后肠蛋白发酵。改善前肠蛋白质消化,从而增加蛋白质的消化,减少结肠未消化氨基酸的流入,降低蛋白质发酵的可能性。可以采取一些措施增加前肠蛋白质的消化与吸收。

日粮总蛋白水平、氨基酸组成以及消化率决定到达后肠的蛋白质数量。在肥育猪中,与饲喂低蛋白(15%)日粮组相比,玉米-豆粕型高蛋白(34%)日粮组有更多的蛋白水解菌群(如弯曲杆菌、类杆菌、梭状芽胞杆菌和普雷沃氏菌)。另外,有报道,与提供必需氨基酸的低蛋白(17.6%)日粮组相比,饲喂高蛋白日粮(22.5%)小猪结肠食糜中有更高的氨氮浓度。同样地,这些作者报道饲喂低蛋白日粮的小猪结肠食糜中有较多的碳水化合物发酵菌(罗斯氏菌),并提出这将导致菌群向更有利于碳水化合物发酵的环境转移。对于禽类,日粮蛋白质的低水平可能对生长性能有副作用,尽管其对肠道物理环境具有有益作用。

3.2 日粮结构

没有研究证实家禽日粮粒度对后肠蛋白发酵

的直接影响。但多项研究可以推测粒度对降低肉鸡后肠蛋白发酵有潜在影响。许多研究显示粗粮日粮改善肉鸡生长性能以及小肠绒毛高度。

生产性能的提高可能因粗饲引起蛋白质消化率提高而引起^[28]。进一步研究显示,粗饲导致嗦囊增大,使胃肠道研磨能力最大化,增强消化能力,同时降低病原菌群,改善健康。粗粮增加腺胃胃蛋白酶分泌,改善嗦囊肌肉物理功能、采食量、增重。在日粮中添加粗颗粒能增加胃液反流,在嗦囊中使食物充分暴露在胃蛋白酶和盐酸中^[30]。由于粗饲,颗粒停留在嗦囊中的时间更长,更有利于饲料的消化。有研究表明,肉鸡嗦囊重与回肠氮消化存在正相关^[30]。可能是由于嗦囊功能的增强,使胃蛋白酶和盐酸更多地接触日粮蛋白质,从而加强蛋白质消化的启动。已报道嗦囊活动的增加,可能与胰腺分泌的诱导息息相关^[31]。与此相反,细颗粒日粮增加食糜粘度^[32],降低营养物质的消化率。可以假设,增加日粮粒度,改善前肠的消化与吸收,从而降低到达后肠的未消化蛋白质数量。

3.3 益生元和益生菌

益生元和益生菌能将肠道菌群的平衡转移到促进潜在健康菌群的数量增加上,比如乳酸杆菌以及双歧杆菌^[33]。益生元被定义为一种日粮成分,在动物前段胃肠道不能被自身的消化酶水解,但是通过诱导结肠健康有益菌群的数量和活性,对宿主有积极影响。益生元多为碳水化合物,可以通过以下途径降低蛋白发酵:(1)结肠中益生元底物的快速发酵降低结肠中 pH 值,从而通过细菌蛋白酶降低肽的活性;(2)阻遏降解物,通过抑制基因转录参与有碳水化合物存在的氨基酸分解代谢;(3)增加用于细菌生物合成的氨基酸数量。益生元的潜在有益效果可能包括对病原体的拮抗作用。

Rehman 等(2008)研究了在肉鸡玉米-豆粕基础日粮中添加 1%菊粉(作为益生元)的影响,结果添加菊粉组盲肠 pH 值低,盲肠氨含量少,BCFA 含量低,丁酸浓度更高,盲肠总生物胺的浓度也很低。这些数据显示,添加菊粉促进糖分解,取代胃肠道肽分解活动。Mookiah 等^[34]研究不同异麦芽低聚糖(作为一种益生元)水平(5、10 g/kg 基础日粮)对肉鸡生长性能、盲肠微生物菌群以及盲肠发酵特性的影响,结果发现,与对照组相比,添加异麦芽低聚糖组 42 日龄时盲肠总 VFA、乙酸、丙酸、丁酸的浓度分别增长 43%、46%、65%、36%。添加益生元组肉鸡

盲肠食糜中总 VFA 的高浓度,可能由于盲肠中乳酸杆菌和双歧杆菌密度高,而大肠杆菌和需氧菌数量较低所致。同样,Faber 等(2012)研究玉米-豆粕型基础日粮中低聚糖对肉鸡艾美耳球虫的免疫反应。与饲喂 SPI 日粮肉鸡相比,饲喂 SBM 组肉鸡生产性能提高,SCFA 产量增加。盲肠乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、总 VFA 浓度分别增长 3.6%、1.2%、3.9%、3.4%。作者认为,VFA 浓度的升高可能促进 SBM 组中低聚糖的发酵,这些低聚糖是肠道上皮细胞最重要的能量来源,同时能诱导细胞生长,提高盲肠重量,产生更多的 VFA 来改善盲肠健康。

益生菌是活的生物体,在日粮中定期添加适当量对宿主有益。益生菌的干预可能影响 SCFA 的生成。与益生元类似,益生菌能诱导肠道微生物的活动,导致氨的吸收量增加,氨基酸或代谢产物转化成细菌成分。益生菌可能对碳水化合物或蛋白质发酵产生间接影响,增加优先发酵碳水化合物且几乎没有蛋白水解活性的细菌菌群。采用多菌种益生菌(包括 11 种乳酸杆菌菌株),研究肉鸡生长性能和盲肠发酵特性。与对照组日粮相比,饲喂多菌种益生菌日粮组 42 日龄肉鸡盲肠中乙酸、丙酸、丁酸和 VFA 的含量分别增加 38%、92%、11%、34%。同样,添加嗜酸乳杆菌降低肉鸡肠道腐败成分,如氨和生物胺^[35]。Chen 等^[25]研究添加益生菌(枯草芽孢杆菌和嗜酸乳杆菌)对肉鸡的影响,结果表明,与对照组及添加抗生素组(黄霉素)相比,35 日龄肉鸡粪便氨低 33.1%及 28.7%, H_2S 低 49.5%和 38.6%。益生菌通过降低肠道 pH 来降低胃肠道病原微生物,导致粪便氨和 H_2S 排放量降低。基于家禽的观察,可以推测日粮中添加益生元和益生菌,可以降低盲肠致病微生物数量来减少后肠蛋白的发酵。

3.4 其他饲料添加剂

饲料添加剂能通过不同的机理保持肠道健康,如改变肠道 pH 值,增强胰液分泌,增加养分摄入,刺激体液免疫反应,选择有益微生物或增加发酵酸,从而降低病原微生物入侵(比如肠炎沙门氏菌、大肠杆菌),增加肠粘膜生长速度^[36]。添加有机酸,特别是有特异性抗微生物活性的 SCFA,是一种改善肠道完整性的很有前景的途径^[37]。这些添加剂对上皮细胞损伤少,因为致病微生物群数量的减少,降低了有毒化学物的产生。有机酸,由于其有杀菌作用,抑制微生物蛋白质发酵,特别是通过破坏其能量代谢,减少肉鸡革兰氏阴性菌的数

量^[38],降低后肠 pH。饲料原料,如低聚糖和 NSP,通过后肠 VFA 的产量,影响后肠 pH。这些 VFA 能提供快速可利用的能量,对肠道健康有积极作用。与其他组织相比,胃肠道需要更高的能量。胃肠道构成体重的 6%,却消耗 25%的氧^[39]。降低 SCFA 的含量,尤其是丁酸,可能导致溃疡性结肠炎,肠道黏膜屏障功能减弱以及炎症条件。丁酸刺激肠道生长,比如上皮细胞增殖和分化,保持绒毛高度。Jang^[40]报道肉鸡提供 0.2%的丁酸甘油酯,FCR 提高 8.6%。丁酸有多种功能,包括肽的诱导和生成,通过结合到后肠特定的 G 蛋白偶联受体,特别是 GPR 41 和 GPR 43。已经报道这些肽中有些对受感染情况下的免疫系统有积极作用,有些能促进肠道蠕动。已被证明其能刺激免疫系统,并减少沙门氏菌在肉鸡胃肠道定植。通常在家禽日粮中使用 SCFA (比如丁酸),被认为可能是抗菌生长剂的替代。

4 结论

目前,没有直接研究发现胃蛋白发酵对肉鸡生长性能的影响。但已有研究报道称,肉鸡回肠和盲肠采集的食糜中有高浓度的蛋白质发酵代谢产物。与回肠相比,盲肠食糜中更高浓度的生物胺、BCFA、H₂S、氨、吲哚、酚、甲酚、粪臭素,表明更多的蛋白水解发酵。某些低浓度的蛋白发酵产物,包括生物胺,对肠道正常发育是必要的。后肠蛋白质发酵对肉鸡肠道健康和生产性能的确切影响仍然知之甚少。研究应进一步阐明蛋白发酵对肉鸡生产性能的影响。营养方法,比如降低日粮蛋白,添加益生元、益生菌、有机酸,或者饲喂大颗粒日粮,可能增加蛋白消化率,降低大肠未消化蛋白的发酵。大多数营养的干预,能潜在增加前段胃肠道蛋白的消化,从而减少后肠用来发酵的未消化蛋白。

参考文献:

- [1] Havenstein G B, P R Ferket, and M A Qureshi. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets [J]. *Poultry Science*, 2003, 82:1509-1518.
- [2] Choct M. Managing gut health through nutrition [J]. *British Poultry Science*, 2009, 50:9-15.
- [3] Jeaurond E A, M Rademacher, P J R luske, et al. Impact of feeding fermentable proteins and carbohydrates on growth performance, gut health and gastrointestinal function of newly weaned pigs [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2008, 88:271-281.
- [4] Meyer B, J Zentek, and A Harlander-Matauschek. Differences in intestinal microbial metabolites in laying hens with high and low levels of repetitive feather-pecking behavior [J]. *Physiology & Behavior*, 2013, 110:96-101.
- [5] Guo F C, B A Williams, R P Kwakkel, et al. In vitro fermentation characteristics of two mushroom species, an herb, and their polysaccharide fractions, using chicken caecal contents as inoculum [J]. *Poultry Science*, 2003, 82:1608-1615.
- [6] Kiarie E, L F Romero, and C M Nyachoti. The role of added feed enzymes in promoting gut health in swine and poultry [J]. *Nutrition Research Reviews*, 2013, 26:71-88.
- [7] Apajalahti J, A Kettunen, H Graham. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities with special reference to the chicken [J]. *World's Poultry Science Journal*, 2004, 60:223-232.
- [8] Lu J, U Idris, B Harmon, et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:6816-6824.
- [9] Gabriel I, S Mallet, and P Sibille. Digestive microflora of bird: factors of variation and consequences on bird [J]. *INRA Production Animales*, 2005, 18:309-322.
- [10] Kadim I T, P J Moughan, V Ravindran. Ileal amino acid digestibility assay for the growing meat chicken-comparison of ileal and excreta amino acid digestibility in the chicken [J]. *British Poultry Science*, 2002, 43:588-597.
- [11] Hendriks W H, J Van Baal, and G Bosch. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants a comparative species view [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108:S247-257.
- [12] Larque E, M Sabater-Molina, and S Zamora. Biological significance of dietary polyamines [J]. *Nutrition*, 2007, 23:87-95.
- [13] Fossum O, Sandstedt K. and B E Engstrom. Gizzard erosions as a cause of mortality in white leghorn chickens [J]. *Avian Pathology*, 1988, 17:519-525.
- [14] Barnes D M, Y K Kirby, and K G Oliver. Effects of biogenic amines on growth and the incidence of proventricular lesions in broiler chickens [J]. *Poultry Science*, 2001, 80:906-911.
- [15] Macfarlane G T, G R Gibson, E Beatty, et al. Estimation of shortchain fatty acid production from protein by human intestinal bacteria based on branched-chain fatty acid measurements [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 101:81-88.
- [16] Faber T A, R N Dilger, A C Hopkins, et al. The effects of a galactoglucomannan oligosaccharide-arabinoxy-

- lan (GGMO-AX) complex in broiler chicks challenged with *Eimeria acervulina* [J]. *Poultry Science*, 2012, 91: 1089-1096.
- [17] Meyer B, W Bessei, W Vahjen, *et al.* Dietary inclusion of feathers affects intestinal microbiota and microbial metabolites in growing Leghorn-type chickens [J]. *Poultry Science*, 2012, 91: 1506-1513.
- [18] Meyer B, J Zentek, and A Harlander-Matauschek. Differences in intestinal microbial metabolites in laying hens with high and low levels of repetitive feather-pecking behavior [J]. *Physiology & Behavior*, 2013, 110: 96-101.
- [19] Abdl-Rahman M, S Y Saleh, A Z Amal, *et al.* Growth performance, caecal fermentation and blood biochemistry of rabbits fed diet supplemented with urea-bentonite combination [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2011, 3: 14-21.
- [20] Namroud N F, M Shivazad, and M Zaghari. Effects of fortifying low crude protein diet with crystalline amino acids on performance, blood ammonia level, and excreta characteristics of broiler chicks [J]. *Poultry Science*, 2008, 87: 2250-2258.
- [21] Khempaka S, C Chitsatchapong, and W Molee. Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers [J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2011, 20: 1-11.
- [22] Lewis S, and S Cochrane. Alteration of sulphate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit rate [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2007, 102: 624-633.
- [23] De Preter, V, I Arijs, K Windey, W Vanhove, *et al.* Decreased mucosal sulphide detoxification is related to an impaired butyrate oxidation in ulcerative colitis [J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2012, 18: 2371-2380.
- [24] Chavez C, C D Coufal, J B Carey, *et al.* The impact of supplemental dietary methionine sources on volatile compound concentrations in broiler excreta [J]. *Poultry Science*, 2004, 83: 901-910.
- [25] Chen K, J Gao, J Li, *et al.* Effects of probiotics and antibiotics on diversity and structure of intestinal microflora in broiler chickens [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012(6): 6612-6617.
- [26] CVB (Central Bureau for Livestock Feeding) (2007) Veevoedertabel 2007, Centraal Veevoederbureau, Lelystad, The Netherlands.
- [27] De Lange L, C Rombouts, and O G Elferink. Practical application and advantages of using total digestible amino acids and undigestible crude protein to formulate broiler diets [J]. *World's Poultry Science Journal*, 2003, 59: 447-457.
- [28] Engberg R M, M S Hedemann, S Steinfeldt, *et al.* Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract [J]. *Poultry Science*, 2004, 83: 925-938.
- [29] Nir I, R Hillel, G Shefet, *et al.* Effect of grain particle size on performance, 2. Grain texture interactions [J]. *Poultry Science*, 1994, 73: 781-791.
- [30] Pacheco W J, C R Stark, FERKET P R, *et al.* Evaluation of soybean meal source and particle size on broiler performance, nutrient digestibility, and gizzard development [J]. *Poultry Science*, 2013, 92: 2914-2922.
- [31] Hetland H, Svihus B, and Å Krogdahl. Effects of oat hulls and wood shavings on digestion in broilers and layers fed diets based on whole or ground wheat [J]. *British Poultry Science*, 2003, 44: 275-282.
- [32] Amerah A M, V Ravindran, R G Lentle, *et al.* Feed particle size: Implications on the digestion and performance of poultry [J]. *World's Poultry Science Journal*, 2007, 63: 439-455.
- [33] De Preter V, H M Hamer, K Windey, and K Verbeke. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55: 46-57.
- [34] Mookiah S, C C Sieo, K Ramasamy, *et al.* Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94: 341-348.
- [35] Gallazzi D, A Giardini, M G Mangiagalli, *et al.* Effects of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL on laying hen performance [J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2009(7): 27-38.
- [36] Cummings J H, and G T Macfarlane. Gastrointestinal effects of prebiotics [J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87: S145-S151.
- [37] Adil S, T Bandy, G A Bhat, M S Mir, *et al.* Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken [J]. *Veterinary Medicine International*, 2010, 10: 4061-4067.
- [38] Gunal M, G Yayli, O Kaya, *et al.* The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers [J]. *International Journal of Poultry Science*, 2006(5): 149-155.
- [39] Britton R, Krehbiel C. Nutrient metabolism by gut tissues [J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76: 2125-2131.
- [40] Jang J P. Comparative effect of achillea and butyric acid on performance, carcass traits and serum composition of broiler chickens [J]. *Annals of Biological Research*, 2011(2): 469-473.

2016年我国猪营养与饲料研究概况

王丽, 李平, 高开国, 杨雪芬, 马现永, 王志林

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

摘要: 与世界平均水平相比, 我国母猪繁殖性能仍存在差距, 其中合理的营养与饲料配制技术仍是制约因素之一; 仔猪断奶应激导致腹泻, 严重影响养殖效益, 一直是养猪业棘手的问题; 长期、过量使用抗生素类药物, 不仅导致耐药菌增加, 而且造成猪肉产品中抗生素类药物残留超标, 危害人体健康; 蛋白质饲料原料日益紧缺仍然是生猪养殖面临的世界性问题。针对目前生猪养殖面临的问题, 本文主要介绍了国内学者在提高母猪生产效率综合养殖技术、仔猪肠道健康的营养调控技术、无抗猪肉与饲料营养和安全保障技术、饲料资源评价与饲养标准研究等四个方面所开展的研究工作, 为我国生猪产业健康可持续发展提供技术支撑。

关键词: 母猪生产效率; 仔猪肠道健康; 无抗猪肉; 饲料资源评价; 饲养标准

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0022-02

虽然近年国内养猪水平不断提高, 但是国内生猪生产环境、管理水平依然较低, 猪的健康水平较低, 繁殖性能不高, 疾病发生率高, 药物使用量大, 未能发挥最大生产潜力。针对这些问题, 国内学者开展了提高母猪生产效率综合养殖技术、仔猪肠道健康的营养调控技术、无抗猪肉与饲料营养和安全保障技术、饲料资源评价与饲养标准研究, 带动了全国猪营养饲料研究的发展方向。

1 提高母猪生产效率综合养殖技术

本领域的研究主要围绕营养调控和饲养管理两个方面展开。关于母猪营养调控技术, 目前主要侧重母子一体化营养研究、母猪饲料原料的选择及霉菌毒素的防控、高产母猪饲料配方关键技术研究、蛋白发酵饲料研究进展及其在母猪日粮中的应用、母猪的乳腺发育及其营养调控等。①提高母猪繁殖力的营养调控技术, 主要研究日粮营养成分和功能性营养物质对母猪繁殖性能、乳成分的调控作用; 研究母-子一体化均衡营养方案, 提高母猪窝仔数, 仔猪均匀度和成活率; ②加强母猪优质能量和蛋白质原料的选择, 通过霉菌毒素吸附剂、营养性复合抗霉添加剂等防止霉菌毒素危害母猪生殖系统; ③加强高产母猪饲

料配方关键技术研究, 研究发酵豆粕、纤维素、共轭亚油酸等对母猪繁殖性能的影响, 同时提高母猪采食量和泌乳力; ④适时调控母猪的乳腺发育, 提高哺乳仔猪的生长速度, 重点开展了营养水平, 能量来源与水平, 纤维来源、组分与水平, 氨基酸来源(谷氨酰胺、缬氨酸、牛磺酸等)、水平与比例, 维生素来源(叶酸等), 添加剂(植物提取物、有机酸、有机微量元素、酵母细胞壁等)对母猪繁殖性能及后代健康的影响, 为研究集成提高母猪生产效率的营养技术方案提供了一定的理论依据。

关于母猪饲养管理技术, 围绕提高母猪繁殖利用率、人工授精与深部输精技术的应用、降低新生-哺乳仔猪死亡率和改善母猪福利条件等展开了相关研究, 包括母仔猪生产系统管理关键技术研发与示范(母猪配种监测、饲养环境调控、精准饲喂方式、加强后备母猪管理、增加母猪淘汰率、管理规程建立等方面精细化母猪饲养管理技术), 猪场标准化、规范化生产配套技术体系等。研发发现通过耳朵传感器进行定位和加速度测量可描述母猪活动模式, 自发性行为用于检测镇痛药的效果或对母猪围产期疼痛鉴定可能更

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 国家生猪产业技术体系专项(nycytx-36)

作者简介: 王丽(1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向仔猪营养, E-mail: wanglil@gdaas.cn

有效;使用惯性传感器可自动定量母猪姿势状态和转化,对提高家畜福利和生产效率有巨大潜力。增加占地面积对群养母猪的探索性和社会行为有积极作用;在母猪个体水平上,增加混养的空间位置有利于改善母猪福利指标。

2 仔猪肠道健康的营养调控技术

在全球饲料禁用抗生素趋势日益凸显的条件下,以健康方式防治仔猪腹泻成为了我国仔猪营养研究的焦点。针对这一难题,我国仔猪营养研究热点主要集中仔猪肠道健康的营养调控研究,尤其是断奶仔猪抗生素替代系列产品和微生态平衡营养调控技术研发。该领域研究主要聚焦于发酵饲料(主要为发酵豆粕)、益生菌(植物乳杆菌、酪酸梭菌、枯草芽孢杆菌)、植物提取物(牛至油、中草药提取物)、酶制剂(非淀粉多糖复合酶、植酸酶等)、抗菌肽、功能性氨基酸(甘氨酸、谷氨酰胺)和多糖(低聚木糖、参多糖、稀士壳糖等)等营养调控手段及饲料蛋白水平对断奶仔猪肠道健康、肠黏膜发育、肠道菌群调节、黏膜屏障功能保护的影响,其中一半以上的研究旨在探索饲用抗生素的有效替代技术,结果不同程度的展现了这些物质降低仔猪腹泻、改善肠道通透性、缓解肠道损伤和保护肠道屏障等功能。值得一提的是,多种营养性添加剂联合应用(如益生菌+酶制剂、植物提取物+功能性氨基酸等)技术的提出,为无抗饲料配制技术提供了更多元化的理论和技术支持。通过上述研究,集成了改善仔猪健康、促进仔猪生长的综合营养调控技术及替代产品。

3 无抗猪肉与饲料营养和安全保障技术

此技术研究涉及领域广,主要开展了饲用抗生素替代物、肉品质营养调控技术研究、非常规饲料原料开发等。饲用抗生素替代物方面的研究方向同仔猪方面相似。肉质方面的研究热点主要是通过各种调控方式改善胴体品质,改善肉品风味,使得猪肉更加满足人们对健康及风味的要求。研究侧重于植物提取物及中草药(中草药添加剂、植物源性物质如糖萜素、石榴皮提取物、香辛料提取物、牛至香酚、大蒜素、花椒提取物、银杏叶提取物、红松提取物、柿子皮、杜仲多酚、忍冬叶粉等)、微生态制剂或发酵物质(纳豆芽孢杆

菌、菌种复合发酵饲料、生物酵素、微生物发酵饲料、中草药发酵制剂、枸杞渣发酵、豆渣发酵)、营养物质(维生素、微量元素、氨基酸比例、低蛋白日粮、脂肪来源)等对肉质的改善作用以及屠宰、运输、饲养环境等对肉质的影响。另外研究了新型肉品质评定检测方法,如径向基神经网络在猪胴体瘦肉率预测中的应用、农畜产品品质安全光学无损快速检测技术、基于 DSP 的便携式猪肉品质无损快速检测装置的研发、于流形模糊聚类算法的高光谱图像猪肉品质分类研究等。在非常规饲料原料开发方面,重点关注了新型生物饲料、功能性营养物质以及发酵饲料等在猪饲料中的应用;成功设计出系列抗菌肽,开展了生物学活性及抑菌机理的研究;并探讨了微生物发酵非常规饲料原料的相关发酵条件,为研发新型生物蛋白饲料及生物添加剂新产品提供了新思路。

4 饲料资源评价与饲养标准研究

饲料资源评价主要围绕非常规资源的饲用开发而展开。饲料原料尤其是蛋白质饲料原料日益紧缺仍然是生猪养殖面临的世界性问题。为了降低生猪养殖成本,(1)在生长和肥育阶段添加食品副产物(肉骨粉、面包粉和次小麦粉)也成为开发饲料资源的一条新途径;蛋黄酱、杏仁粉、液体面包副产品和高水分玉米在生长猪液体饲料中具有较大的应用前景;厨房废弃物的固体部分资源化加工作为猪饲料;不同处理方式的甘薯(煮熟、青贮、甘薯粉)、不同类型的油菜籽副产物的体外发酵添加至饲料中可显著改善营养成分利用率,进而提高日增重和饲料转化率。(2)海产品在猪饲料中的研发也逐渐兴起。仔猪饲料中添加适量海星对生产性能没有负面影响,在饲料中添加海星时,要考虑日粮钙的水平;海藻可以作为饲料碘源,同时海藻及其提取物海带多糖可作为益生元添加至猪饲料中,能够改善猪的肠道健康,提高生产性能。(3)DDGS 在不同阶段猪饲料中的最大添加量仍研究较多。断奶仔猪和生长肥育猪日粮中添加 DDGS,并平衡氨基酸替代豆粕,对采食量没有影响,但随着 DDGS 添加量的增加,对生产性能和腹部肌肉硬度的负面效应逐渐增加。

(下转第 36 页)

黄羽肉鸡心包积水-肝炎综合征的诊断与防控

卢受昇, 孙彦伟, 余希尧, 高慧敏, 邓国东
(广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230)

摘要: 心包积水-肝炎综合征 (Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS), 是鸡新发一种的危害较大的传染病, 近年来在北方一些省份流行。2016年6月, 某市一鸡场发生疑似病例, 死亡率40%, 经病毒分离、PCR诊断及序列测定等方法确认为该病。本次黄羽肉鸡的发病特点为发病急、死亡快, 但心包积液不明显, 剖检病变极易与禽流感、新城疫等相混淆, 需引起关注, 根据发病特点提出鉴别诊断方法, 以提高基层对本病的发现能力。

关键词: 心包积水综合征; 禽腺病毒4型; 诊断
中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2017)01-0024-03

Diagnosis and Control of Hydropericardium Hepatitis Syndrome in Commercial Yellow Feather Broilers

Lu Shousheng, Sun Yanwei, Yu Xiyao, Gao Huiming, Deng Goudong
(Guangdong Provincial Institute of Animal Health Supervision, Guangzhou 510230, China)

Abstract: Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS is a novel outbreak chicken infectious disease in China, and caused a huge economic loss in the poultry industry. In recent years, HHS has been epidemic in Shandong, Henan, Jiangsu provinces. On June 2016, a farm emerged suspected cases in Guangdong province, the mortality was 40%. and by virus isolation and PCR detection and sequence were confirmed as HHS. The characters of clinical syndromes in Yellow Feather Broiler was by acute onset, dying, but Hydropericardium lesions was not obvious. And the necropsy lesions should confuse extremely with avian influenza and Newcastle disease, this is should be pay more concerned. Differential diagnosis methods based on the characteristics of the disease was provided, in order to improve the ability of the primary organization to diagnosis the disease.

Key words: Hydropericardium hepatitis syndrome; Fowl adenovirus serotype 4; Diagnosis

心包积水-肝炎综合征 (Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS), 是一种新发的危害较大的传染病, 现已明确该病由腺病毒科禽腺病毒属 I 群 C 种 4 血清型的病毒 (Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 引起。该病首先于 1987 年在巴基斯坦的安卡拉地区发现, 故又称安卡拉病。近年韩国有流行^[1], 2011 年我国山东白羽肉鸡出现该病^[2], 其后河南、湖北、江苏、安徽、江西等省流行^[3-5]。除白羽鸡外, 蛋鸡、黄羽鸡及地方品种均可发病。该病以传染性强, 发病急、死亡率高为特征,

对生产可造成较大的损失。广东是黄羽鸡的养殖大省, 由于该病尚无疫苗、商品化的诊断试剂等, 一旦传入防控难度大, 近年我们加强了对该病的关注, 2016 年 6 月, 某市一鸡场发生异常死亡, 发病鸡群规模 6 000 羽, 分 5 个棚舍于林间放养, 品种为麻黄鸡, 46 天龄时发病, 高峰时每天死亡达 200 余只, 至全群扑杀处置时 (发病后 15 d), 全群死亡率约 40%, 首发棚舍死亡率已达 57%。临床表现为发病急, 出现症状后几分钟至数小时内死亡。剖检见腺胃近食道端带状出血, 肌胃角质膜下轻

收稿日期: 2016-12-08

作者简介: 卢受昇 (1972-), 男, 高级兽医师, 博士, 从事预防兽医学研究, E-mail: ssLu2013@163.com

度出血。肝肝大、点状出血或坏死,但心胞积液不明显,仅少数鸡只出现心胞液增多的情况。现将有关诊断情况介绍如下,供读者参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 心、肝、脾、肺、肾、胸腺,喉头拭子、泄殖腔拭子,采自某鸡场病死鸡。

1.1.2 试剂 禽流感病毒通用型荧光 RT-PCR 试剂盒、新城疫病毒荧光 RT-PCR 试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司。PCR 预混试剂 Premix Exq 宝生物工程(大连)有限公司产品。营养琼脂、血液琼脂、麦康凯琼脂培养基为广州环凯微生物科技有限公司产品,在使用时自行配制;SPF 鸡胚购自广东永顺生物制药股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 常规细菌分离 无菌操作采集 4 只病死鸡的肝脏、心血,分别接种于营养琼脂、血液琼脂、麦康凯琼脂平板培养基,37℃培养 72h。

1.2.2 鸡胚分离 内脏组织按 1:5 加 PBS 研磨,5 000 prm 离心 10 min,上清过细菌滤器,经尿囊腔接种 9 日胚龄 SPF 鸡胚,0.2 mL/个,置 37℃孵育。

1.2.3 禽流感、新城疫的荧光 RT-PCR 检测 对病死鸡的肝脏、喉头拭子、泄殖腔拭子样品,按相应荧光 RT-PCR 试剂盒使用说明书进行检测。

1.2.4 腺病毒 PCR 检测及序列测定 用特异性引物^[3] P1:5'-CGCTTCGCCAAGTCTCAGTACAAT-3', P2:5'-CGGAGTCGTGATACAGCAGGTT-3' 扩增长度约为 295 bp。由上海立菲生物技术有限公司合成。PCR 扩增采用 50 μL 体系, Premix Taq 2 × 25 μL、上下游引物各 1 μL、去离子水 20 μL、提取核酸校本 3 μL; 反应程序为 98℃ 10s, 53℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 延伸 8 min。产物电泳回收后,送上海立菲生物技术有限公司进行测序。

2 结果

2.1 临床症状与剖检病变

发病鸡出现精神沉郁,驱赶或捉拿时,挣扎几下即死亡。剖检见腺胃、肌胃角质膜下出血。肝肝大



图 1 临床症状与剖检病变

A. 病鸡精神沉郁; B. 肝脏出血坏死; C. 腺胃、肌胃出血

出血或坏死,胫骨骨髓变黄,但心胞积液不明显,仅少数鸡只出现心胞液增多的情况。详见图 1。

2.2 常规细菌分离、禽流感通用、新城疫荧光 RT-PCR 检测

结果均为阴性。排除禽流感、新城疫、禽出败等常见烈性传染病。

2.3 病毒分离鉴定

鸡胚连续观察 96 h,均未出现死亡,收获尿囊液。经 PCR 鉴定,结果为阳性,说明分离到病毒,将该病毒分离株命名为 GD01。血凝试验检测,结果该病毒对鸡红细胞没有凝集作用。

2.4 腺病毒 PCR 结果

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,可见 295 bp 左右的特异条带(图 2),与预期大小相符。

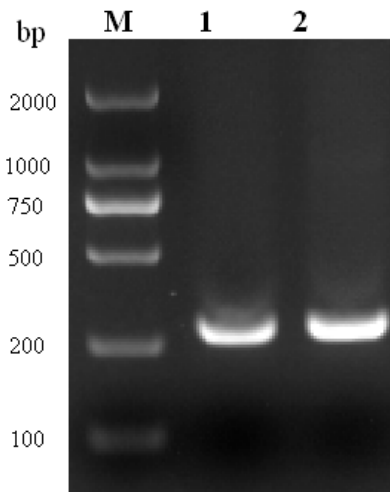


图 2 PCR 扩增结果

M, DNA Marker DL2000; 1-2 样品

2.5 序列分析

将所得基因序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较,结果与国内发表的山东、河南、河北、湖北、江苏等地的禽腺病毒 I 群 C 种 4 血清型序列

Fowl aviadenovirus C isolate JSJ13 株(序列号 KM096544)、SDSX 株(序列号 KT899325.1)、HN/151025 株(序列号 KU245540.1),相似性达 100%,前 50 个序列均为 fadv4 毒株。从 GenBank 数据库中选取不同省份的种的参考株山东、河北、河南和江苏各 1 株(序列号分别为 KT999720、KU877420、KU133746 和 KM096544),以及印度、巴基斯坦、韩国各 1 株(序列号分别为 AJ459805、K2175724、HQ709225),用软件 MEGA 5.05 进行多序列匹配排列,以 Neighbor-Joining 方式进行同源性比较,并绘制进化树。结果发现所扩增的 295 bp hexon 基因序列与国内 4 个毒株及巴基斯坦毒株 K2175724 相似性达 100%,与印度毒株 AJ459805 相似性达 99.7%,与韩国毒株 HQ709225 则有一定差异,相似性为 96%,见图 3。

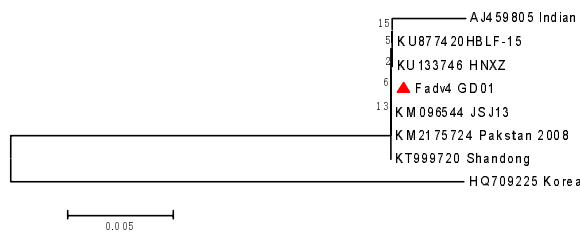


图 3 禽腺病毒 hexon 基因部分片段序列基因遗传进化分析

3 讨论

3.1 结合临床快速死亡等流行病学特点,以及剖检病变、病毒分离、PCR 与序列测定结果,本病例诊断为心包积水-肝炎综合征。此前,该病在广东地区未见报道,因其病死率高,对生产造成较大的损失,需引起关注。

3.2 对于黄羽鸡,本次病例中呈现出心包积液不明显,且肝肿大出血特征只占 50%,因此剖检病变不典型,临床上不易发现,需引起注意。由于该病还有腺胃及肌胃角质膜有出血病变,且死亡率高。临床上极易与禽流感、新城疫相混淆;肝脏病变易误诊为禽出败。临床上可通过综合考虑禽流感新城疫免疫程序的规范性,或经实验室进行抗本水平检测,与流感与新城疫相鉴别;从抗菌药物治疗的有效性上与禽出败相鉴别。另本病还有一大特征,即发病急,死亡快,出现症状后,数小时或几分

钟内死亡,前述几种疾病的死亡速度没有这么迅速;另本病表现为没有出现呼吸道、消化道症状,也不减料,可将这一临床特征通俗形容为“快死亡、不咳嗽、不拉稀、不减料”,便于基层人员认识本病。

3.3 防治措施。该病暂时没有疫苗和药物防治。主要措施有:①首先加强生物安全防止疫病的传入。②加强饲养管理,由于鸡只肝脏受损严重,减少饲料中蛋白质的含量,有利于减少死亡率。③加强消毒措施。该病可通过机械方式和污染物在鸡群间接触性传播,在同一鸡群中主要通过粪一口途径进行水平传播,该病毒对碘制剂敏感,据报道饮水中添加碘伏使其终浓度达到 0.07%~0.10%,可缩短肉鸡感染 HPS 的病程并降低死亡率。④有把反映抗体治疗效果良好。⑤该病还可垂直传播,需加强种禽监测净化工作。⑥抗体结合自家组织苗有较好的效果。

3.4 虽然该病尚未列入《一、二、三类动物疫病病种名录》,由于本病康复鸡仍可间歇性的排毒,本次病例处置中,当地动物防疫部门采取了严格的扑杀和无害化处理措施,及时地消灭了病原,有效防止了疫原的扩散。对首发地区建议采用扑杀和无害化处理措施,更有利于本病的防控。

参考文献:

- [1] K S Choi, S J Kye, J Y Kim, et al. Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea [J]. Poultry Science, 2012, 91: 2502-2506.
- [2] 韩新会. 鸡包涵体肝炎的流行特点和治疗 [J]. 家禽科学, 2014(5): 45.
- [3] 常维山, 王涛, 等. 鸡心包积液综合征(安卡拉病)病原分离检测 [J]. 中国动物保健, 2015, 17(12): 25-26.
- [4] Jianqiang Ye, Guangchen Liang, Jianjun Zhang, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. Emerging Microbes and Infections, 2016(5): 50-51.
- [5] 罗玲, 赵康, 张媛, 等. 鸡心包积水综合征病原的分离与鉴定 [J]. 中国禽业, 2016, 38(6): 56-58.
- [6] 刘新富, 马凤洲. 心包积水-肝炎综合征的诊断与防治 [J]. 技术前沿, 2015(11): 32-33.

一例黄羽肉鸡滑液囊支原体的诊治

梁盛昌¹, 陈立²

(1. 广东省吴川市动物卫生监督所, 广东 湛江 524500; 2. 湛江市动物疫病预防控制中心, 广东 湛江 524037)

摘要: 滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS), 常引起鸡的呼吸道问题和滑液囊炎, 近期本市一些鸡场出现流行, 本文介绍一个病例诊断与治疗过程, 为当前防控本病提供参考。

关键词: 滑液囊支原体; 诊断; 治疗

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0027-02

滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS), 是鸡和火鸡的一种急性或慢性的传染性疾病。常表现为亚临床型上呼吸道感染, 有时可引起系统性感染导致传染性滑膜囊炎, 主要涉及关节的滑液囊膜及腱鞘, 引起渗出性滑液囊炎、腱鞘炎或黏液囊炎^[1]。该病曾于2008年前后在当地有流行, 2016年又有抬头的趋势^[2], 现将近期确诊的一个病例的诊治情况进行介绍, 供读者参考。

1 发病过程

一养殖户饲养黄羽肉鸡5200多只, 62天龄开始出现症状, 2周后达到高峰, 高峰期发病率4%, 经过治疗后, 全程淘汰率约为1.5%。

2 症状与病变

病鸡表现为鸡冠苍白, 羽毛蓬乱, 不愿站立, 行走困难, 一瘸一拐, 但呼吸道症状不明显。主要可见病变为跗关节、趾关节肿胀, 剖检可见浓稠的黏液性渗出, 部分鸡只出现胸骨处皮下有囊肿。详见图1。



图1 剖检病变

A. 趾关节肿胀; B: 黏液渗出

3 实验室诊断

3.1 常规细菌分离

无菌操作采集鸡的病变关节渗出液, 分别接种于营养琼脂、血液琼脂、麦康凯琼脂平板培养基, 37℃培养72h, 结果未见有常规致病菌生长。

3.2 PCR 诊断

取病变关节渗出液送有关实验室进行PCR诊断, 结果为阳性。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 可见814 bp左右的特异条带(图2), 与预期大小相符。

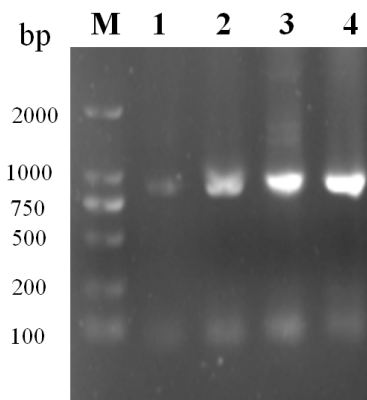


图2 PCR 扩增结果

M、DNA Marker DL2000; 1-4 样品

4 治疗

对全群采用泰妙菌素、强力霉素、氟苯尼考进

收稿日期: 2016-12-01

作者简介: 梁盛昌(1962-), 男, 兽医师, 从事动物疫病防控工作, E-mail: 1727895877@qq.com

行治疗。具体治疗方案为 45%延胡索酸泰妙菌素可溶性粉 30g+ 10%的盐酸多西环素可溶性粉(强力霉素)50g+ 10%氟苯尼考 40g, 兑水 100 kg, 夜间饮水用药, 连续 5 天。效果明显, 第 4 天病情得到有效控制, 全程淘汰率控制在 1%内。

5 讨论

5.1 该病主要通过垂直传播, 对种鸡开展本病的净化是防制本病的关键, 没有净化条件的需定期投放敏感药物进行控制, 切断垂直传播途径。养殖户进苗时需了解种鸡健康情况, 选择饲养管理规范种鸡场的鸡苗。

5.2 本病发病率不高, 同时出现消瘦、瘸脚情况临床上易与马立克氏病、禽白血病及其他细菌感染相混淆, 需加以鉴别诊断。

5.3 出现本病后, 应及时采用对支原体敏感的药物进行治疗, 否则会导致残次鸡增加, 特别是胸骨处

皮下囊肿影响出售鸡只的质量。丁美娟等[3]对分离自各省菌株进行药敏试验, 结果泰乐菌素较为敏感, 而对恩诺沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星具有不同程度的耐受性。对广东毒株, 除泰乐菌素外, 还有林可霉素、盐酸土霉素敏感。

5.4 该病 2008 年出现流行后, 近期很多地方又出现了流行, 需引起关注。

参考文献:

[1] Y. M. Saif, 主编. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 禽病学[M]. 第 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 861.

[2] 马爽, 郭莉莉, 宋新宇, 等. 鸡滑液囊支原体感染的流行病学调查与分析[J]. 中国家禽, 2016, 38(23): 68-71.

[3] 丁美娟, 卢凤英, 严鹏, 等. 鸡滑液囊支原体不同地区分离株对常用抗菌药物的敏感性试验[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(10): 52-55.



(上接第 14 页)

[8] 朱钦龙. 营养对种蛋孵化率的影响[J]. 中国禽业导刊, 1999, 21: 9.

[9] 马翠然. 维生素对种蛋孵化率的影响[J]. 养禽与禽病防治, 2004(10): 11-12.

[10] 许万祥, 黄玉琳. 矿物元素对孵化率及胚胎发育的影响[J]. 粮食与饲料工业, 1998(3): 27-29.

[11] 郭海霞, 任慧玲. 饲料霉菌毒素对种鸡的危害及预防[J]. 山东畜牧兽医, 2011, 32(10): 78-79.

[12] 杨桂芹, 郑爱娟, 张姝, 等. 用杂粕代替部分豆粕配制日粮对蛋种鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(11): 40-42.

[13] 计成, 杨瑛, 许万根. 黄羽肉种鸡对棉籽粕、菜籽粕、禽副粕氨基酸消化率的比较研究[J]. 动物营养学报, 2002, 14(2): 27-32.

[14] 徐岩, 袁春涛, 刁新平. 棉粕代替豆粕对蛋种鸡生产性能影响的研究[J]. 饲料博览, 2003(7): 3-5.

[15] Shang X G, Wang F L, Li D F, et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid on the productivity of

laying hens and egg quality during refrigerated storage[J]. Poultry science, 2004, 83(10): 1688-1695.

[16] 付友山. 种蛋孵化率低的原因与对策[J]. 中国家禽, 2005, 26(24): 29-30.

[17] 李蕴玉, 李佩国. 影响种蛋孵化率的几个因素(综述)[J]. 河北科技师范学院学报, 2005, 18(4): 68-71.

[18] 刘云志, 杨金生, 黄海楠. 提高种鸡蛋孵化率的有效措施[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012(4): 70.

[19] 王民民, 王平, 吴晓明, 等. 提高肉种鸡受精率和孵化率的综合措施[J]. 中国家禽, 2012, 34(7): 47-48.

[20] 陈合强, 王宏胜, 施海东, 等. 肉种鸡生产中的饲料管理[J]. 家禽科学, 2013(2): 15-20.

[21] 王进友, 丁爱萍. 肉种鸡饲养管理程序初探[J]. 贵州畜牧兽医, 1998(6): 28.

[22] 王志亮, 曹进, 刘清. 种蛋孵前细节管理[J]. 中国畜禽种业, 2009(9): 40-41.

[23] 黑立新, 刘艳花, 张明. 鸡蛋孵化率低的原因与解决办法[J]. 家禽科学, 2005(3): 17-18.

粤东地区半番鸭发生新型小鹅瘟的诊断与防控建议

孙建涛¹, 汪加发², 张思远¹, 卢秀娴¹, 薛素强¹

(1. 广州市华南农大生物药品有限公司, 广东 广州 511300;

2. 黄山强英鸭业有限公司, 安徽 黄山 245061)

摘要: 2016年10月, 广东揭阳地区等地饲养的半番鸭群发生一种以软脚、脱毛、生长发育障碍为临床特征的新疫病, 经PCR鉴定, 该病病原为新型小鹅瘟病毒。鉴于目前还没有针对小鹅瘟病毒变异株的疫苗, 在生产实际中可以选择番鸭细小病毒弱毒疫苗进行免疫预防, 经临床实践取得了不错的防控效果, 值得在粤东地区推广。

关键词: 半番鸭; 新型小鹅瘟病毒; PCR

中图分类号: S858.32

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0029-02

近年来, 广东地区饲养半番鸭的数量越来越多。然而2015年以来广东周边新发疫病不断出现, 使半番鸭饲养的难度逐渐加大。据报道, 2015年2月福建漳州龙海等地区饲养的半番鸭发生一种以软脚、短喙、生长发育障碍为主要特征的疾病, 经陈少莺等^[1]研究证实, 致病病原为新型小鹅瘟病毒。粤东地区与福建漳州相隔很近, 直至2016年上半年都没有相关疫情报道, 但2016年10月, 笔者在广东揭阳地区从事技术服务过程中诊治了一起半番鸭发生新型小鹅瘟病毒的病例。该病例中半番鸭早在15~20日龄开始发病, 晚则在35~40日龄均有发病。15~20日龄病鸭初期表现软脚, 不愿走动, 用跗关节走路; 至35~40日龄时, 鸭群出现脱毛现象(图1), 紧接着发现软脚的病鸭腿会折断, 养户形象地称之为“玻璃鸭”; 日龄再大的鸭子还可见翎羽折断。这些发病鸭群的共同特点就是生长发育不良, 呈现僵鸭(图2), 严重发育不良的僵鸭上市时比正常鸭子轻0.5~1 kg, 养户损失惨重。用氟苯尼考以及抗病毒中草药治疗, 效果微乎其微。

1 材料与方法

1.1 病料采集

本试验所用3份病料均采自揭阳地区发病半



图1 脱毛鸭(右)

图2 僵鸭(下)

番鸭群。病料1采集自28日龄发病、病程5 d、低死亡率的鸭群, 主要表现软脚, 剖检可见心肌出血, 胰腺水肿出血, 肺脏出血等; 病料2采集自30日龄、病程3 d、低死亡率的鸭群, 主要表现软脚、瘫痪, 剖检无明显病变; 病料3采集自51日龄发病、病程5~7 d的鸭群, 主要表现羽毛脱落、折断, 腿骨断裂, 瘫痪, 剖检可见心包炎、气囊炎及肝周炎等临床表现。

1.2 病毒分离

无菌采集发病鸭的脾脏、肝脏、胰腺、肺脏各一小部分, 加入5倍体积预先置4℃冰箱冷藏的PBS(pH 7.2)和终浓度1 000 U/mL的双抗, 剪碎病料后加入一定量石英砂充分研磨, 然后分装、反

收稿日期: 2016-12-14

作者简介: 孙建涛(1984-), 男, 硕士, 执业兽医师, E-mail: sunjiantao@gzscbm.com

通讯作者: 薛素强(1980-), 男, 硕士, 兽医师, E-mail: xuesuqiang@gzscbm.com

复冻融 2 次,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液保存备用。

1.3 PCR 鉴定

1.3.1 病毒 DNA 提取 取上述上清液 500 μ L 至 1.5 mL EP 管中,1000 g 离心 5 min,加入 500 μ L Trizol 试剂,室温静置 5 min,加入 200 μ L 氯仿,振荡 15s,静置 2 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min;取上清,加入 500 μ 异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10 min 后 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 10 min,弃上清,缓缓加入 1 mL 75%乙醇,轻轻洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C、7 500 g 离心 5 min,弃上清,倒置晾干后加入 35 μ L 双蒸水溶解,65 $^{\circ}$ C 促溶 15 min。

1.3.2 引物设计 根据 NCBI 中已登录的小鹅瘟病毒 (GPV) VP3 基因序列 (登录号:1403425) 设计 1 对特异性引物用于 GPV 检测。上游引物 P1:5'-TGCCGATGGAGTGGGTAATG-3'; 下游引物 P2:5'-CCCAGGACATACGGGAGTTG-3',预期扩增片段大小为 414 bp,引物由上海立菲生物技术有限公司合成。

1.3.3 PCR 反应 PCR 反应体系:Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μ L)0.5 μ L,10 \times Pyrobest Buffer II 5 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L,Forward primer 2.5 μ L,Reverse primer 2.5 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 34.6 μ L,混合。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、59 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

采用特异性引物进行 PCR 反应,3 份病料均出现与目的大小一致的条带 (414 bp),与阳性对照大小一致,阴性对照无目的条带出现,表明病料中检测到小鹅瘟病毒 VP3 基因 (图 3)。

综上,确诊揭阳地区发病半番鸭群的病原为小鹅瘟病毒。结合漳州地区防控该病的经验,在 1~3 日龄免疫鸭细小病毒弱毒疫苗 2 头份/只,结果显示,对已发病场地饲养的下一批半番鸭群接种弱毒疫苗,效果比较理想,保护率可达 80%~90%。

3 讨论

关于“短喙和侏儒综合征”的报道可以追溯到 20 世纪 70 年代法国的半番鸭养殖中,之后台湾、

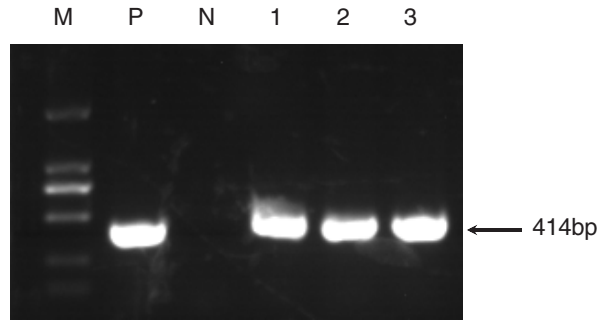


图 3 电泳结果

M: Trans2k DNA Marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照;
1: 病料 1; 2: 病料 2; 3: 病料 3

波兰等地也有类似该病的报道^[2-3]。在我国南方的番鸭养殖中,也发现一些因感染番鸭细小病毒耐过而后出现“僵鸭”的类似症状,到 2014-2015 年,我国境内饲养的樱桃谷肉鸭、半番鸭都有发病的报道,说明细小病毒一直存在变异,感染谱一直扩大,应引起广大肉鸭养殖户的广泛关注。

国内研究人员已证实该病是由细小病毒或新型小鹅瘟病毒引起,并将其称为“鸭短喙长舌综合征”或“鸭短喙和侏儒综合征”^[4-5]。目前该病在半番鸭上的表现与樱桃谷肉鸭上的表现不一致,半番鸭还没有表现出明显的“长舌”症状。从小鹅瘟病毒及番鸭细小病毒的传播特点来推断,该病原的传播方式为垂直传播和水平传播都有可能,但从揭阳地区半番鸭的发病情况来看,垂直传播的可能性不大,原因是同一孵化场出来的鸭苗在不同地区饲养有的发病,有的不发病;而且发过疫病的场地再引入第 2 批鸭子时该批鸭子也会发病,说明该病具有一定的传播能力。

对于该病的防控可以参考番鸭细小病毒病和小鹅瘟病毒,这两种病毒在形态特征、理化特性、基因组结构等方面非常相似^[6],两者具有一定的抗原交叉保护性,它们的共同抗原主要在核衣壳蛋白 VP3,而 VP1 和 VP2 蛋白存在抗原性差异^[7]。因此,从疾病防控层面来看,切实可行的方法即是采用现有的细小病毒疫苗来进行防控。由于该病是新发疫病,病原与细小病毒和小鹅瘟病毒在抗原性上存在差异,因此研发更具针对性的新型小鹅瘟病毒疫苗是目前科研人员的首要任务。

(下转第 33 页)

鬼针草可溶性颗粒对鸡急性肝损伤保护研究

钟勇锋^{1,2}, 刘志昌^{1,2}, 容庭^{1,2}, 李书宏^{1,2}, 彭广辉^{1,2}, 王刚^{1,2}

(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 广州 510640;
2. 广州五丰动物保健品有限公司, 广东 广州 510640)

摘要: 本试验旨在研究饲料中添加不同浓度鬼针草可溶性颗粒对CCl₄致岭南黄肉鸡急性肝损伤保护程度的影响。选取1日龄体重相近的健康岭南黄肉鸡270只, 随机分为6个组(健康对照组、鬼针草可溶性颗粒低、中、高剂量组, 联苯双酯组及肝损伤模型组), 每组3个重复, 每个重复15只。各重复组均饲喂基础饲料, 饲养至30日龄开始试验, 试验期为7d。采用CCl₄致鸡急性肝损伤试验为动物模型, 检测分析鸡血清中的AST、ALT、SOD水平以及肝匀浆中MDA、GSH-Px含量, 评价药物对鸡肝损伤的临床保护效果。结果表明, 与模型组比较, 中高剂量组鬼针草可溶性颗粒可显著降低鸡血清ALT和AST水平(P<0.05和P<0.01), 显著提高血清SOD水平(P<0.05和P<0.01), 显著提高肝匀浆中GSH-Px活性和降低MDA含量(P<0.05和P<0.01)。由此可见, 鬼针草可溶性颗粒对CCl₄致岭南黄肉鸡急性肝损伤有明显的保护作用。

关键词: 鬼针草; 可溶性颗粒; 鸡; 急性肝损伤; 保护

中图分类号: S853.75

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0031-03

鬼针草(*Bidens bipinnata* L.)系菊科鬼针草属一年生草本植物, 又名婆婆针、鬼钗草、小鬼针、黏身草等, 药用历史悠久, 具有解热、止泻、解毒和活血散瘀等功效。鬼针草属植物资源非常丰富, 约230种, 中国有9个种和2个变种, 目前调查结果发现, 鬼针草在广东省低海拔地区普遍分布, 已成为广东省危害最严重的入侵杂草之一^[1]。由于其庞大的种子库, 防制效果不佳, 为充分开发、利用鬼针草植物的药用资源, 可达到“以用代防”的目的。

本研究通过给予岭南黄鸡单次腹腔注射CCl₄制备岭南黄鸡急性肝损伤模型; 通过检测鬼针草可溶性颗粒不同给药剂量岭南黄鸡的血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)活力、肝匀浆中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)含量, 评价其保肝护肝作用效果, 为鬼针草可溶性颗粒在畜禽生产的应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及饲养

试验于2015年4月份在广东省农科院畜牧研究所试验场地完成, 饲养期42天; 试验选择同1天孵化的1日龄健康岭南黄肉仔鸡270只, 饲养至30日龄开始试验, 试验期为7d。仔鸡均在全封闭式保温育雏舍内饲养, 全天24h光照, 自由采食和饮水, 整个试验期采用全价饲料(不含抗菌药物), 其主要营养指标: 1~21日龄粗蛋白20%, 能值为11.70 MJ/kg; 22~42日龄, 粗蛋白18%, 能值为12.12 MJ/kg, 配方值参考鸡饲养标准(NY/T 33-2004)。试验采用免疫程序完全相同, 鸡舍平均温度约25℃, 期间鸡只未发生疾病, 采用常规消毒。

1.2 药品与试剂

鬼针草可溶性颗粒(自制, 总黄酮含量为24.62 mg/g); 联苯双酯, 广州星群药业股份有限公司生产; 丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 广东省科技计划项目(2012B020305010)

作者简介: 钟勇锋(1979-), 男, 兽医硕士, 助理研究员。从事中草药提取物研究。E-mail: 21306677@qq.com

通讯作者: 王刚(1968-), 兽医硕士, 硕士生导师。E-mail: 1322773418@qq.com

氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;实验所需的其他药品及试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器与设备

XW-80A型旋涡混合仪,上海青浦沪西仪器厂生产;AB135-S电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司生产;804(R)/5801(R)型台式高速离心机,德国Eppendorf生产;1800型自动生化分析仪,美国Glamour公司生产。

1.4 药物的配制

鬼针草颗粒低、中、高剂量组配制:临用前用生理盐水配成总黄酮浓度为15、30、60 mg/mL的鬼针草溶液。联苯双酯:临用前用0.5%羧甲基纤维素钠配至浓度为5 mg/mL的混悬液。

1.5 试验动物分组及处理

试验随机分为6个组,每组3个重复,每个重复15只。各重复组均饲喂基础饲料。6个组分别为健康对照组、肝损伤模型组、鬼针草可溶性颗粒低、中、高剂量组(总黄酮含量分别为50、100、200 mg/kg)3组和阳性对照药联苯双酯组(20 mg/kg)。健康对照组和肝损伤对照组以等容积生理盐水灌胃,其余各重复组每天灌胃(ig)给药1次,连续7d,于末次给药后1h,除健康对照组外,其余各组均按体重一次性腹腔注射0.1% CCl₄油溶液3 mL/kg,造成鸡急性肝损伤,健康对照组则腹腔注射等量豆油。注射CCl₄后禁食过夜,以提高肝损伤效果。末次给药后24h后,翅静脉采血,分离血清,同时将鸡处死,取小块肝脏组织,用冷生理盐水洗去浮血,用滤纸吸去水分,称取0.5g肝组织,加5 mL冷生理盐水制成10%的肝匀浆,按试剂盒说明检测蛋白、GSH-Px及MDA。

1.6 测定项目

血液以3000 r/min离心10 min,分离血清,采用全自动生化分析仪测定ALT和AST活性,按试剂盒测定血清中SOD活性;肝组织匀浆以2000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒测定肝组织匀浆中GSH-Px和MDA含量。

1.7 统计学处理

试验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,采用统计软件SPSS 19.0进行ANOVA检验。

2 结果与分析

2.1 药物对CCl₄致鸡急性肝损伤血清转氨酶和

SOD的影响

与正常组比较,模型组鸡血清中ALT和AST极显著性升高、SOD极显著性降低($P < 0.01$,表1),提示造模成功。与模型组比较,鬼针草可溶性颗粒中、高剂量组鸡血清ALT和AST显著降低、SOD显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。结果表明鬼针草可溶性颗粒能显著降低CCl₄导致的肝损伤鸡血清中ALT和AST的水平、升高血清中SOD的水平。

表1 药物对CCl₄致鸡急性肝损伤血清转氨酶和SOD酶的影响($\bar{x} \pm SD, n=10$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	SOD(U/mL)
低剂量组	102.6±25.3	373.1±48.7	246.6±31.3
中剂量组	77.9±15.1 ^{1*)}	332.6±42.9*	298.3±31.2*
高剂量组	63.5±14.0 ^{2*)}	193.6±28.1**	353.4±50.7**
联苯双酯组	57.4±12.9**	173.6±23.2**	281.3±32.6*
肝损伤模型组	129.7±22.3 ^{3*)}	406.8±59.2 ^{##}	233.8±35.7 ^{##}
健康对照组	36.5±6.7	101.4±19.6	395.2±54.9

1):与健康对照组比较,肝损伤模型组##表示差异极显著($P < 0.01$);2):与肝损伤模型组比,中高剂量组*表示差异显著($P < 0.05$),3):**表示差异极显著($P < 0.01$)。下同。

2.2 药物对CCl₄致鸡急性肝损伤肝匀浆MDA和GSH-Px的影响

与正常组比较,模型组鸡肝组织中MDA显著性升高($P < 0.01$,表2),GSH-Px显著性降低($P < 0.01$),提示造模成功。与模型组比较,鬼针草可溶性颗粒中、高剂量组能够显著抑制MDA的升高($P < 0.05, P < 0.01$),并且能够显著升高GSH-Px的含量($P < 0.05, P < 0.01$)。

3 讨论

CCl₄诱导的肝损伤模型是急性肝损伤研究的典型模型。目前认为,CCl₄引起肝细胞中毒与其自由基代谢产物导致机体脂质过氧化有关^[2]。肝组织是丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)主要分布场所,在肝细胞中,ALT、AST分布于细胞浆和线粒体中,正常胞质中无明显外漏,血清ALT、AST含量很少,当肝实质细胞受损或坏死时,胞质中的ALT、AST大量外漏,血清中ALT、AST水平明显升高,提示肝细胞破坏,细胞膜通透性增加及线粒体损伤,是肝细胞损伤的敏感指标^[3]。本实验过程中,模型组注射0.1% CCl₄后,与正常组

表2 药物对CCl₄致鸡急性肝损伤肝匀浆 GSH-Px、MDA 的影响 ($\bar{x} \pm SD, n=10$)

组别	MDA(mmol/mgprot)	GSH-Px(U/mgprot)
低剂量组	51.9±14.4	256.9±33.7
中剂量组	60.5±18.2*	225.3±23.9*
高剂量组	68.1±17.9**	169.3±15.5**
联苯双酯组	49.0±15.6	226.5±43.4*
肝损伤模型组	41.3±12.8**	285.7±36.1**
健康对照组	87.6±16.2	103.2±23.6

比较,血清中 ALT 和 AST 含量显著增高 ($P < 0.01$),表明肝细胞受损严重。与模型组比较,鬼针草可溶性颗粒各剂量组能够显著抑制 ALT 和 AST 的增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),说明鬼针草可溶性颗粒能显著降低 CCl₄ 导致的肝损伤鸡血清中 ALT 和 AST 的水平。

肝脏脂质过氧化的程度可通过测定脂质过氧化物等来评价;MDA 是氧自由基与细胞膜表面不饱和脂肪酸反应(脂质过氧化反应)的产物,可严重破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、坏死。MDA 在血清及组织中的含量高低,间接反映了机体细胞受自由基攻击时组织的过氧化损伤程度^[4]。因此,测定肝匀浆中 MDA 含量的水平可反映肝脏损伤情况。本实验过程中,模型组注射 0.1% CCl₄ 后,与正常组比较,肝浆中 MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$),表明肝细胞受 CCl₄ 攻击后损害严重。与模型组比较,鬼针草可溶性颗粒各剂量组能够显著抑制 MDA 的升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。SOD 是细胞内天然的氧自由基清除酶,又是超氧阴离子的底物诱导酶,它可使超氧阴离子歧化为 H₂O₂^[5]。

GSH-Px 是灭活氧自由基的一种酶,可将 H₂O₂ 转化为无任何毒性的水,还能阻断体内脂质过氧化物的进程,使脂质过氧化物还原成无害的羟基化合物^[6]。测定 SOD 和 GSH-Px 能够客观的反应肝脏的受损情况。本实验过程中,模型组注射 0.1% CCl₄ 后,与正常组比较,SOD 和 GSH-Px 含量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,鬼针草可溶性颗粒各剂量组能够显著升高 SOD 和 GSH-Px 的含量。结果表明鬼针草可溶性颗粒保肝作用机制可能与其抗氧化作用有关,提高 SOD 和 GSH-Px 活性,清除自由基,阻止肝细胞脂质过氧化,维持细胞质膜的正常结构,降低肝细胞的损伤程度。

参考文献:

- [1] 李伟华,冯莉,周先叶,等.外来入侵杂草的分布及其土壤 NH₄⁺/NO₃⁻ 生境特征研究[J].华南师范大学学报(自然科学版),2014,46(5):105-111.
- [2] 冯芹,夏文凯,王现珍,等.连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2015,31(3):426-430.
- [3] 杨错,刘玉兰,张红梅.柴胡乳剂对急性化学性肝损伤的保护作用[J].沈阳药科大学学报,2006,23(2):105-108.
- [4] 贾睿,曹丽萍,杜金梁,等.水飞蓟素对四氯化碳致肝(细胞)损伤的保护和抗氧化作用[J].中国水产科学,2013,20(3):551-560.
- [5] Liu Q, Kong B, Li G, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of porcine plasma protein hydrolysates on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(6):1316-1321.
- [6] Huo H Z, Wang B, Liang Y K, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(10):6529-6543.

(上接第 30 页)

参考文献:

- [1] 陈少莺,程晓霞.半番鸭新型小鹅瘟病毒病研究简报[J].福建农业科技,2015(7):23-25.
- [2] Palya V, Zolnai A, Benyeda Z, et al. Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus [J]. Avian Pathol, 2009, 38(2):175-180.
- [3] Lu Y S, Lin D F, Lee Y L, et al. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in duckings in Taiwan [J]. Avian Dis, 1993, 37(2):591-596.
- [4] 陈浩,窦砚国,唐熠,等.樱桃谷肉鸭短喙长舌综合征病原的分离鉴定[J].中国兽医学报,2015,35(10):1600-1604.

- [5] 宁康,王丹,王府民,等.樱桃谷北京鸭短喙和侏儒综合征的初步研究[J].中国兽医杂志,2015,51(10):7-13.
- [6] Wang C Y, Shieh H K, Shieh J H, et al. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in Escherichiacoli and their use in serological assays [J]. Avian Pathol, 2005, 34:376-382.
- [7] Takehara K, Nakata T, Takizawa K, et al. Expression of goose parvovirus VP1 capsid protein by a baculovirus expression system and establishment of fluorescent antibody test to diagnose goose parvovirus infection [J]. Arch Virol, 1999, 144:1639-1645.

鸡骨髓源树突状细胞体外转化培养

何静怡, 罗成龙*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 为深入探讨家鸡获得性免疫应答的分子机制, 本研究探索了体外定向诱导和分化鸡骨髓源树突状细胞(Dendritic cell, DC)的方法。通过体外分离鸡骨髓源细胞, 加入重组的鸡粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素4(IL-4)定向诱导培养获得大量未成熟DCs, 经过接种新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)而激活, 对其进行细胞形态学鉴定。结果表明: 诱导4d后, 部分细胞由单一的圆形球状逐渐生长呈短梭状; 诱导6d后, 细胞在40倍镜下可见基本呈短梭状且部分伸出触手; 接种NDV后, 细胞体积增大, 触手伸长, 形态趋于成熟, 说明已成功建立体外利用细胞因子诱导分化鸡骨髓源DC的方法。

关键词: 鸡; 树突状细胞; 新城疫病毒

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2017)01-0034-03

Inducing and Differentiating Chicken Bone Marrow Dendritic Cells in Vitro

He Jingyi, Luo Chenglong*

(State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding & Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To further explore molecular mechanism of adaptive immune response in chicken, this study built a method of inducing and differentiating chicken bone marrow dendritic cells (DC) in vitro. Herein, the bone marrow cells were isolated from chicken in vitro, were induced a large amount of immature DCs with chicken GM-CSF and IL-4, and then were activated by Newcastle disease virus (NDV). The results showed that chicken bone marrow cells were gradually grown from the round ball to the shape after 4 days of culturing, and the cells were short and some stretched out in 40 times of the lens after 6 days of culturing, and the cell volumes increased and the shape became mature after the NDV immunization. To sum up, the method of producing a large number of chicken DCs in vitro was successfully established.

Key words: chicken; dendritic cell; Newcastle disease virus

树突状细胞(Dendritic cells, DC)是功能最强的抗原提呈细胞(Antigen presenting cells, APC),能高效地捕获、加工处理和传递抗原^[1]。成熟的DC具有显著的树突状结构,不仅能有效激活初始型T细胞,还能刺激其增殖,是启动、调控、并维持免疫应答的中心环节。自1973年Steinman

和Cohn^[2]首次分离出树突状细胞后,各实验室对DC分离、纯化、免疫应答机制的研究就成了热点课题。近几年,对人源和鼠源树突状细胞的分离和纯化方法已相当成熟^[3-5],但是在家禽领域,特别是典型代表动物——鸡来源DC的研究却较为稀缺。本研究将探索如何建立体外细胞因子诱导分

收稿日期:2016-12-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31402067)、广州市科技计划项目(201506010017)、国家肉鸡产业技术体系专项(nycytx-42)。

作者简介:何静怡(1990-),女,实验员,E-mail:hjypuppy@163.com

通讯作者:罗成龙(1981-),男,副研究员,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:chenglongluo1981@163.com

化鸡骨髓源 DC 的方法,并以新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)为抗原观察 DC 的激活情况。

1 材料

倒置显微镜为 OLYMPUS 公司产品。75%乙醇由本实验室配制;红细胞裂解液和 PBS 粉剂均为 Solarbio 公司产品,ddH₂O 配制成 0.01M PH7.2-7.4,高压灭菌,4℃保存;chicken GM-CSF 和 chicken IL-4 均为 KINGFISHER BIOTECH 公司产品,PBS 配制成 40ng/μL 储存液,过滤除菌,-80℃保存;使用时,完全培养基至终浓度为 20ng/mL,现配现用;澳洲源胎牛血清(FBS)、RPMI1640 和青链霉素抗生素为 GIBCO 产品;NDV lasota 株为广东永顺生物制药股份有限公司产品。细胞培养相关耗材购自 Thermo 公司;剪刀、镊子和 1 mL 注射器购自广州市丛源仪器有限公司。

2 实验动物

1 日龄的岭南黄[®]雏鸡由广东省农业科学院动物科学研究所提供。

3 方法

3.1 鸡树突状细胞体外转化

将雏鸡窒息处死后浸泡于 75%酒精中;待皮毛完全湿润后,在无菌超净台内,用剪刀和镊子分离出股骨和胫骨,并置于 PBS 中;去除上皮和肌肉,PBS 清洗 3-5 次;剪去两端软骨,PBS 冲洗骨髓至发白为止,收集组织液;组织悬液移至 15 mL 离心管,1 400 rpm/min 离心 5 min,弃去上清;1 mL 红细胞裂解液静置 3 min;加入等体积 PBS 终止反应,1 400 rpm/min 离心 5 min,弃去上清液;5 mL 完全培养基(含 GM-CSF 和 IL-4 的 10%FBS RPMI1640)重悬沉淀;100 μm 细胞筛网过滤悬液;以 5×10⁷ 个/mL 接种于 12 孔板中,39℃、5 %CO₂ 培养,隔天换液;显微镜观察和记录。

3.2 接种 NDV

培养至第 6 天,每孔接种 100 μL NDV lasota 株,39℃、5%CO₂ 培养 24 h 后显微镜观察和记录。

4 结果与分析

4.1 鸡 DCs 体外分化的形态学鉴定

由图 1 可见,经过细胞因子 GM-CSF 和 IL-4

诱导培养第一天(1d),细胞为圆形或椭圆形、部分细胞悬浮呈半贴壁状态;第二天(2d)后细胞基本贴壁,部分细胞拉长延伸呈短棒状;到培养的第 4 天(4d),细胞开始迁移,慢慢聚集成团;随着细胞因子的不断补给,第 6 天(6d)成团细胞增多,细胞形态多样,大多数细胞已伸出触手。从细胞形态学上看,鸡骨髓源细胞经过 6 天选择性培养基的体

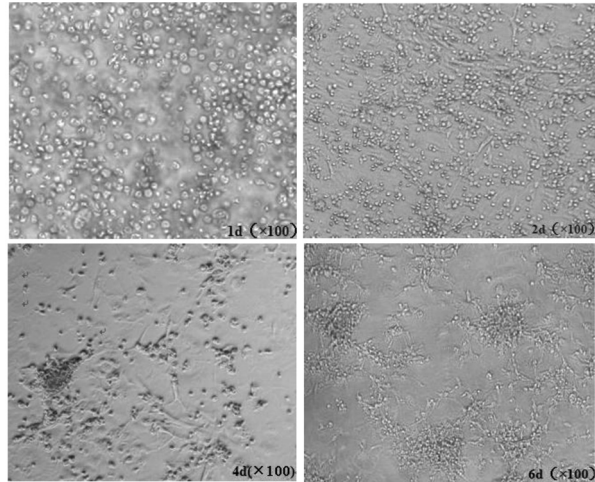


图 1 DC 体外分化培养不同时期的形态

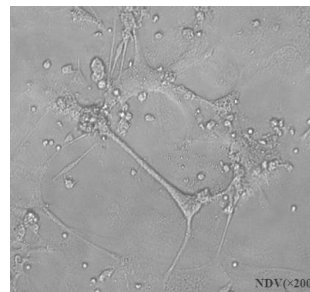


图 2 接种 NDV 24h 后 DC 的形态

外诱导已基本分化成未成熟的 DC。

4.2 NDV 接种后 DC 形态学鉴定

由图 2 可见,DC 接种 NDV 培养 24 h 后,细胞体积变大,出现树突状或伪足样突起,触手伸长,呈现典型成熟 DC 的细胞学形态。细胞间间距加大,触手相互交联。

5 讨论

家禽体内 DC 分布广泛但是数量极少,仅通过分离很难满足科研需要,因此 DC 的体外分离培养成为当今家禽科学领域的热点和难点。本研

究开展了鸡骨髓源 DC 的体外培养转化,过程中利用了两种细胞因子,其中 GM-CSF 是维持骨髓细胞分化的基础细胞因子,可将骨髓细胞分化成巨噬细胞、单核细胞及树突状细胞等多种免疫细胞,但不可定向分化;而 IL-4 是 DC 细胞体外定向分化的重要细胞因子,两者协同作用即可进行体外定向分化。此方法可培养出具有未成熟细胞形态的 DC。作为抗原提呈细胞,经过新城疫病毒的刺激,DC 呈现出典型的成熟树突状细胞的形态(图 2)。

与分离小鼠来源 DC 的方法相比,分离鸡来源的 DC 既相似又存在差异。其中最为突出的差异是,鸡 DC 培养到第 2 天明显看出细胞已呈短梭状且伸出触手;但小鼠 DC 需要培养到第 4 天才能看到典型形态特征^[3]。另外,实验动物体型以及鸡源 GM-CSF 和 IL-4 细胞因子产品的广泛性都有很大的不同。

本研究选用家鸡为实验动物,分离骨髓源原代细胞,利用体外细胞因子体外诱导分化,NDV 进

一步刺激,成功转化培养出具有与体内形态学特征相同的成熟 DC。成功建立体外细胞因子诱导分化鸡骨髓源 DC 的方法,不仅为研究鸡 DC 的功能,还为研究禽类病原的致病机理和免疫机理等提供可靠的体外实验材料。

参考文献:

[1] 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(3):161-168.
 [2] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. morphology, quantitation, tissue distribution [J]. J Exp Med, 1993, 137:11.
 [3] 杨洪艳, 张义国, 董子明, 等. 小鼠骨髓源和脾来源树突状细胞的分离与扩增培养[J]. 河南医科大学学报, 1999, 34(1): 19-22.
 [4] 朱学军, 曹雪涛, 于益芝, 等. 人外周血树突状细胞的体外扩增及鉴定[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1997, 4(4):302-306.
 [5] 刘天明, 刘英博, 付越, 等. 淫羊藿苷对小鼠骨髓源树突状细胞分化及成熟的影响[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(7):75-78.



(上接第 23 页)

(4) 麦类作为饲料资料的应用。断奶仔猪日粮中使用大麦替代小麦作为谷物的能量来源可以改善生产性能。小麦麸型日粮中添加木聚糖酶可改善总能和营养物质的表观总消化率、表观回肠消化率,液体预处理不能进一步提高其营养价值。

在饲养标准方面围绕饲料营养价值评定方法和猪营养需要量两个方面开展研究。关注的焦点主要为:(1)方法学研究:主要集中在有效能、氨基酸消化率和内源损失、钙磷评价方法上,其中磷的消化率方法研究明显增多;(2)饲料添加剂功效和影响研究:主要包括单一酶、复合酶、有益菌、功能性糖类、功能性氨基酸、精油、酸化剂、甜味剂、植物提取物、脂肪酸、有机微量元素、维生素等,种类多,涉及面广,其中酶制剂的研究较多;(3)饲料原料营养价值评定与饲料加工:涉及

常规和新饲料原料化学成分、有效能、氨基酸消化率的评价,也包含饲料原料对生长性能、生理生化、肉品质等指标的影响。另外,不同饲料形态、加酶与否、不同加工工艺间比较也研究较多,可以看出饲料原料营养价值评价工作仍是基础和热点。(4)关于饲养标准(营养需要量)方面,研究也很丰富,主要集中在不同能量和蛋白水平间处理比较、不同饲喂制度和个别氨基酸比例研究。另外,仔猪和母猪的营养需要受到格外关注,磷的需要量研究较多。综上可以发现,饲料营养价值评定和营养需要量研究领域在不断扩大,与育种、环境、免疫、饲养管理、饲料加工、饲料添加剂、微生物、动物生理等方面的结合越来越紧密,提示我们未来此方面的工作要注意学科间交叉,开阔思路,加强多学科间合作。

检测鸭坦布苏病毒 NS1 抗体 ELISA 方法的建立

孙敏华¹, 郭建伟^{1,2}, 李林林¹, 董嘉文¹, 邝瑞欢¹, 吴玄光², 张建峰¹, 胡奇林^{3*}, 张春红^{1*}

(1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3. 福建农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 为了检测鸭群中鸭坦布苏病毒的血清学流行情况, 本研究在前期成功表达鸭坦布苏病毒 NS1 蛋白的基础上, 建立了检测鸭血清中鸭坦布苏病毒抗体的间接 ELISA 方法。棋盘法确定了当纯化的 NS1 蛋白包被量为 0.188 $\mu\text{g}/\text{孔}$, 待检血清 1:200 稀释, HRP 标记的兔抗鸭二抗 1:16000 倍稀释时反应条件最佳。在最佳反应条件下, 阴阳性临界值判定标准为 0.467。用建立的间接 ELISA 方法对番鸭细小病毒、鹅细小病毒、鸭肝炎病毒、鸭疫里默氏杆菌阳性血清进行了检测, 均无交叉反应, 表明该方法具有良好的特异性。批内和批间重复试验的最大变异系数分别为 6% 和 10%, 显示该方法具有很好的稳定性。用建立的 ELISA 方法检测临床鸭坦布苏病毒感染鸭及攻毒蛋鸭的 55 份临床血清样品, 测得 52 份为阳性, 阳性率为 94.5%, 对 36 份阴性鸭群血清样品进行检测, 36 份为阴性, 阴性率为 100%。该方法为鸭坦布苏病毒的诊断和流行病学监测奠定了基础。

关键词: 鸭坦布苏病毒; NS1 蛋白; ELISA

中图分类号: S858.32; Q349+.55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2017)01-0037-04

Establishment of an ELISA Assay for the Detection of NS1 Protein of Duck Tembusu Virus

Sun Minhua¹, Guo Jianwei^{1,2}, Li Linlin¹, Dong Jiawen¹, Kuang Ruihuan¹,
Wu Xuanguang², Zhang Jianfeng¹, Hu Qilin^{3*}, Zhang Chunhong^{1*}

(Guangdong Open Laboratory of Public Health, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: To surveillance the serological prevalence of Duck Tembusu Virus antibodies in duck flocks, an indirect ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) was established based on the recombinant NS1 protein which successfully expressed previously. When NS1 protein coated with a dosage of 0.188 microgram per well ($\mu\text{g}/\text{well}$), the positive serum undergone 1:200 dilution, and enzyme labelled antibody diluted to 1:16000, the assay was optimal with a cut-off value of 0.467. The high specificity made the assay reacted with none of the these positive sera, including Muscovy duck parvovirus, Goose parvovirus, Duck hepatitis virus, and Riemerella anatipestifer. The intra- and inter- coefficient of variabilities were 6% and 10% respectively, which suggested the assay was stable. Clinical tests showed that 52 of 55 sera collected from infected or challenged ducks were positive, and 36 sera collected from negative ducks all gave negative results. In conclusion, this method could be useful for the detection and surveillance of duck Tembusu virus.

Key words: Duck Tembusu virus; NS1 protein; ELISA

收稿日期: 2016-12-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B020307001, 2013B020315005, 2014A040401048, 2015B020203003, 2015B050501007, 2015B070701015), 广东省农业科学院院长基金项目(201412)

作者简介: 孙敏华(1984-), 男, 湖北荆门人, 助理研究员, 主要从事病毒分子生物学及分子免疫学研究。

E-mail: smh2002smh@163.com

*: 通讯作者

鸭坦布苏病毒病(Duck Tembusu Virus Disease)是由鸭坦布苏病毒(Duck Tembusu Virus, DTMUV)引起的一种急性传染病。该病可导致蛋鸭,种鹅在短时间内出现明显的产蛋下降症状,且病程可长达数周^[1,2]。近来,有报道表明其感染的宿主范围有扩大趋势,从最初感染蛋鸭,到感染蛋鸡、蛋鹅等禽类,乃至肉用家禽^[3,4]。该病病原属于黄病毒科(Flaviviridae),黄病毒属(Flavivirus),坦布苏病毒(Tembusu virus)^[5-7]。尽管该病死亡率不高,但危害巨大,给家禽养殖业带来巨大的经济损失。

鸭坦布苏病毒基因组长约 11 kb,顺序为 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'^[5]。其中,C、prM、E 是编码病毒结构蛋白的基因,NS 为编码非结构蛋白的基因。其中,NS1 基因长度为 1 065 bp,由 352 个氨基酸组成。许多报导证实黄病毒科中许多病毒的 NS1 基因具有保守性和抗原性^[8,9],可发生抗体增强效应^[10,11]。本研究利用 pET32a 原核表达载体成功表达 NS1 蛋白,随后利用重组表达蛋白作为包被抗原,建立了 DTMUV-NS1 间接 ELISA 抗体检测方法,为鸭坦布苏病毒病的诊断以及血清学调查奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

NS1 蛋白由郭建伟^[12]表达,HRP 标记的兔抗鸭 IgG 购自 Nordic 公司,OPD 购自北京鼎国生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 抗原最佳包被浓度和最佳血清稀释度的确定 用棋盘方阵滴定法,将纯化后的 NS1 蛋白用 0.05 M pH 9.6 碳酸盐缓冲液从 15.04 μ g/mL, 7.52 μ g/mL, 3.76 μ g/mL, 1.88 μ g/mL, 0.94 μ g/mL, 0.47 μ g/mL 依次进行倍比稀释,每孔 100 μ L 包被酶标板,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。然后弃去孔内溶液,用 PBST 洗 3 次后,加入含 0.2%明胶的 PBST 37 $^{\circ}$ C 封闭 1h。阳性血清和阴性血清分别从 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 进行倍比稀释,37 $^{\circ}$ C 作用 1h 后,洗涤 3 次,再加入 1:5000 稀释的兔抗鸭二抗,37 $^{\circ}$ C 作用 1h,洗涤 3 次后拍干。加入新鲜配制的 OPD 底物显色液,作用 10 min,再加入 2 M 硫酸 50 μ L/孔终止反应,用酶标仪测定 OD_{490nm} 值。

1.2.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定 采用 1.2.1 试验中得出的最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度,将兔抗鸭 IgG-HRP 二抗从 1:2 000~1:64 000 进行倍比稀释后进行测定,以确定酶标二抗的最佳工作浓度。

1.2.3 酶标二抗最佳工作时间 采用最佳抗原包被浓度、最佳血清稀释度以及最佳二抗稀释浓度,将酶标二抗分别作用 30 min、45 min、60min、90 min,测 OD_{490nm} 值,以确定酶标二抗的最佳工作时间。

1.2.4 间接 ELISA 阴性和阳性临界值的确定 用上述建立的间接 ELISA 方法,对试验室保存的 36 份蛋鸭 DTMUV 阴性血清进行检测。每份样品重复 2 孔,测 OD_{490nm} 值,计算样本的平均值(\bar{X})和标准方差(SD),根据统计学原则,样本的 OD_{490nm} 值 > 阴性样本 OD 均值(\bar{X})+2 \times SD(标准方差)时,可以在 99.5%的水平上判定为阳性。

1.2.5 特异性试验 用建立的间接 ELISA 方法分别检测 DHV、DEV、MPV、GPV 和 RA 等阳性血清,以验证本试验建立的间接 ELISA 方法是否对其它病毒或细菌的阳性血清有交叉反应性。

1.2.6 敏感性试验 按最佳反应条件进行试验,将 DTMUV 阳性血清做 1:100~1:6400 倍比稀释,其余条件按上述试验步骤进行。

1.2.7 重复性试验 批内重复性试验:用建立的间接 ELISA 方法测定 4 份 DTMUV 阳性血清和阴性血清。血清按 1:200 稀释,加到同一批抗原包被的 ELISA 板中,每份血清做 6 孔平行,根据每份血清的 OD_{490nm} 值计算出标准差,进而计算出每份血清 OD_{490nm} 值的板内变异系数。批间重复性试验:将 NS1 蛋白按最佳包被浓度包被 ELISA 酶标板,不同时间分 3 次试验,分别对 4 份 DTMUV 阳性血清和 4 份阴性血清进行间接 ELISA 检测,对结果进行统计学分析。

1.2.8 间接 ELISA 方法的临床应用 用建立的 ELISA 方法检测本试验室所采集的临床鸭坦布苏病毒感染鸭及攻毒蛋鸭血清样品 55 份及正常未感染的蛋鸭血清样品 36 份,计算阴阳性检出率。

2 结果

2.1 抗原最佳包被浓度和最佳血清稀释度的确定 方阵滴定显示,当血清的稀释度为 1:200,抗

原每孔包被量为 0.188 μg 时(表 1), 阳性血清的 OD_{490nm} 值可达 1.045, 而对应孔阴性血清的 OD_{490nm} 值为 0.193, 阴性与阳性血清的 OD_{490nm} 比值最大 (P/N=5.415)。因此, 选择 1:200 为最佳血清稀释度, 0.188 μg/孔为抗原的最佳包被量。

表 1 方阵滴定的 OD₄₉₀ 值

血清	抗原浓度					
	15.04 μg/mL	7.52 μg/mL	3.76 μg/mL	1.88 μg/mL	0.94 μg/mL	0.47 μg/mL
阳性	1.737	1.768	1.657	1.753	1.479	1.134
1:50 阴性	0.457	0.357	0.432	0.392	0.426	0.415
P/N	3.801	4.952	3.836	4.472	3.472	2.733
阳性	1.395	1.511	1.418	1.313	1.155	1.015
1:100 阴性	0.309	0.289	0.312	0.307	0.323	0.285
P/N	4.515	5.228	4.545	4.277	3.576	3.561
阳性	1.482	1.327	1.214	1.136	1.045	0.646
1:200 阴性	0.297	0.249	0.236	0.234	0.193	0.210
P/N	4.990	5.329	5.144	4.855	5.415	3.076
阳性	0.985	0.906	0.851	0.807	0.701	0.503
1:400 阴性	0.182	0.173	0.158	0.152	0.156	0.132
P/N	5.412	5.237	5.386	5.309	4.494	3.811

2.2 酶标二抗最佳工作浓度的确定

当酶标二抗兔抗鸭 IgG-HRP 以 1:16 000 稀释时, 阳性值更接近于 1。因此, 将 1:16 000 确定为酶标二抗的最佳工作浓度(表 2)。

表 2 酶标二抗最佳工作浓度

二抗浓度	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000
阳性血清 (OD _{490 nm})	3.341	2.824	1.962	1.287	0.781	0.479
阴性血清 (OD _{490 nm})	0.959	0.642	0.459	0.288	0.171	0.113

2.3 酶标二抗最佳作用时间

兔抗鸭 IgG-HRP 以 1:16000 稀释, 作用 45 min 时阳性血清与阴性血清的 OD_{490nm} 值比值最大。因此, 将该 45 min 确定为酶标二抗的最佳作用时间。

2.4 间接 ELISA 阴阳性临界值的确定

对 36 份 DTUV 阴性血清进行间接 ELISA 检测。其平均值 \bar{X} 为 0.203, 标准差 SD 为 0.132, 根

据公式: 阴阳性临界值 = $\bar{X} + 2 \times SD$, 试验临界值为 0.467。即待测样品的 OD_{490nm} 值 ≥ 0.467 时为阳性, OD_{490nm} 值 < 0.467 则为阴性。

表 3 间接 ELISA 特异性试验结果

项目	GPV	MPV	DEV	DHV	RA
OD 值	0.126	0.318	0.093	0.322	0.103

2.5 特异性试验

用建立的间接 ELISA 方法对 GPV、MPV、DEV、DHV 和 RA 的阳性血清进行测定, 其 OD_{490nm} 值如表 3 所示, 阳性血清 OD_{490nm} 值均小于阴阳性临界值 0.467。

2.6 敏感性试验

按最佳条件进行包被, 将 DTUV 阳性血清分别进行 1:100~1:6 400 倍比稀释, 其余条件按最适反应条件进行间接 ELISA。结果显示, 1:800 稀释时, 其 OD 值仍然大于 0.467(表 4), 因此该方法的敏感性大于 1:800。

表 4 间接 ELISA 敏感性试验结果

血清浓度	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
阳性血清 (OD _{490nm})	0.869	0.817	0.711	0.484	0.357	0.279	0.178
阴性血清 (OD _{490nm})	0.162	0.132	0.102	0.085	0.084	0.074	0.074

2.7 重复性试验

批内重复性试验: 将 8 份 DTUV (阳性血清, 阴性血清各四份) 血清用同一批包被的酶标板检测, 重复 6 孔, 计算标准偏差和平均值。结果表明试验中变异系数最大为 6%, 最小为 1%。批间重复性试验: 不同时间内包板, 分别做三次试验, 检测上述 8 份血清, 每孔做 6 个平行孔, 计算标准偏差和平均值。结果表明: 批间变异系数最大为 10%, 最小为 3%。

2.8 间接 ELISA 方法的临床应用

用建立的 ELISA 方法检测临床鸭坦布苏病毒感染鸭及攻毒蛋鸭血清样品 55 份, 测得 52 份为阳性, 阳性率为 94.5%; 对未感染 DTUV 的 36 份血清样品进行检测, 36 份全部为阴性, 阴性率为 100%。

3 讨论

鸭坦布苏病毒自 2010 年 4 月被发现以来, 其暴发和流行给蛋种鸭、鹅的养殖造成了巨大的经济损失。因此, 该病的预防、诊断等措施一直广为关注。本研究在前期表达出有活性的 NS1 蛋白的基础上, 探索了应用间接 ELISA 方法检测鸭血清中鸭坦布苏病毒抗体的可能, 为该病的血清学诊断提供了重要依据。

由于鸭坦布苏病毒不具有血凝活性, 加之中和试验费时费力, 不利于快速检测, 因此建立可靠的 ELISA 检测方法不失为一种重要的, 行之有效的手段。姬希文等^[13]以纯化的 DTMUV 作为间接 ELISA 的包被抗原, 证明全病毒具有较好的抗原性和免疫原性, 与 AGP 试验结果相比较, 其检出 DTMUV 阳性率高。随后, 姬希文^[14]和郝明飞^[15]等建立了检测 E 蛋白抗体的间接 ELISA 方法, 这些检测方法均可以为该病血清型监测提供依据。本研究以 NS1 蛋白作为包被抗原, 成功建立了检测鸭坦布苏病毒抗体的间接 ELISA 方法。试验结果证实该方法有较好的敏感性高, 阳性血清 1:800 稀释仍然能够检出; 特异性强, 不与其他病毒或者细菌的阳性血清发生交叉反应; 重复性好, 批间和批内变异系数均小于 10%。本试验为鸭坦布苏病毒病的诊断和检测以及血清学调查奠定了基础。

由于 NS1 蛋白属于非结构蛋白, 但是由于黄病毒科中一些成员的 NS1 蛋白为糖蛋白^[16], 而鸭坦布苏病毒的 NS1 蛋白也具有 3 个潜在糖基化位点, 因此可能无法应用于区分灭活疫苗和野毒感染。为了验证 NS1 蛋白本研究通过与 E 蛋白 ELISA 方法^[17]对比发现, E 蛋白 ELISA 检测阳性的样品用 NS 蛋白 ELISA 检测也呈阳性, 二者 OD 值相关性明显, 因此 NS1 蛋白抗体间接 ELISA 方法无法区分灭活疫苗和野毒感染时的蛋鸭血清样品。

参考文献:

- [1] Li Linlin, An Hejia, Sun Minhua, et al. Identification and genomic analysis of two duck-origin Tembusu virus strains in southern China [J]. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 105-112.
- [2] 孙敏华, 胡奇林, 董嘉文, 等. 鸭坦布苏病毒江门株的分离鉴定及其 E 基因系统进化分析[J]. *广东农业科学*, 2012(11): 158-160.
- [3] Han K K, Huang X M, Li Y, et al. Complete Genome Sequence of Goose Tembusu Virus, Isolated from Jiangnan White Geese in Jiangsu, China[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(2): e00236-12.
- [4] 陈仕龙, 陈少莺, 王劭, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. *福建农业学报*, 2011, 26(2): 170-174.
- [5] Su J, Li SH, Hu X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related Flavivirus [J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(3): e18106.
- [6] Cao Z Z, Zhang C, Liu Y H, et al. Tembusu Virus in Ducks, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(10): 1873-1875.
- [7] 滕巧洪, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(6): 1-4.
- [8] Schlesinger J J, Brandriss M W, Walsh E E. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48[J]. *J Immunol*, 1985, 135: 2805-2809.
- [9] Gould E A, Buckley A, Barrett A D, et al. Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice [J]. *J Gen Virol*, 1986, 67: 591-595.
- [10] Chung K M, Liszewski M K, Nybakken G, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19111-19116.
- [11] Liu Z, Ji Y, Huang X, et al. An adapted duck Tembusu virus induces systemic infection and mediates antibody-dependent disease severity in mice[J]. *Virus Res*, 2013, 176(1-2): 216-222.
- [12] 郭建伟, 董嘉文, 孙敏华, 等. 鸭坦布苏病毒 NS1 基因的克隆及原核表达[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(1): 71-73.
- [13] 姬希文, 闫丽萍, 颜丕熙, 等. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(8): 631-634.
- [14] 姬希文. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白单克隆抗体的制备及间接 ELISA 方法的建立[M]. 内蒙古农业大学. 2012.
- [15] 郝明飞, 张琳, 胡北侠, 等. 鸭坦布苏病毒包膜蛋白的原核表达和间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(12): 17-22.
- [16] Ding X, Hu D, Chen Y, et al. Full serotype-and group-specific NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid differential diagnosis of dengue virus infection [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(3): 430-434.
- [17] 董嘉文, 孙敏华, 李林林, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白原核表达及其免疫原性研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(2): 33-36.

猫乳腺纤维腺瘤的临床诊治

叶镜岳¹, 陈义洲^{2,3}

(1. 惠州市农业学校, 广东 惠州 516023; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;
3. 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.293

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0041-03

1 病例基本情况

9月龄折耳猫, 雌性未绝育。乳腺突然出现肿大, 该猫这几天有接受其他公猫爬跨现象, 怀疑处于发情期。

2 临床检查

体温 39.1℃, 体格偏胖, 心跳呼吸无明显异常, 精神状态良好, 有完整的免疫和体内驱虫史, 没有进行严格的体外驱虫。

临床视诊发现该猫 4 对乳腺均出现不同程度的肿块, 肿块质地坚实, 游离性差(见图 1)。第二对乳腺和左侧第一对乳腺肿块较大, 最大的肿块直径约为 3 cm。触诊肿块时该猫没有表现出明显的疼痛反应。



图 1 多个乳腺出现大小不等的肿块

3 实验室检查

血常规和血生化检查未见异常。见表 1、2。

用 5 mL 注射器对肿物进行细针抽吸, 制作细

表 1 血常规检查结果

检查项目	结果	变化	检查项目	结果	变化
WBC	8.4×10 ⁹ /L	-	LYM%	0.350	-
RBC	9.93×10 ¹² /L	-	OTHR%	0.574	-
HGB	122g/L	-	EO%	0.076	-
HCT	0.404	-	LYM#	2.9×10 ⁹ /L	-
MCV	40.7fL	-	RDW#	4.8×10 ⁹ /L	-
MCH	12.3pg	↓	EO#	0.7×10 ⁹ /L	-
MCHC	302g/L	-	RDW-SD	37.7fL	-
PLT	234×10 ⁹ /L	-	RDW-CV	0.108	-

表 2 血清生化检查结果

检查项目	结果	单位	参考范围
ALB	26	g/L	23-40
ALKP	69	U/L	23-212
ALT	88	U/L	10-100
AMYL	765	U/L	500-1500
UREA	6.5	mmol/L	2.5-9.6
Ca	2.46	mmol/L	1.98-3.00
CHOL	2.18	mmol/L	2.84-8.27
CREA	83	umol/L	44-159
GLOB	40	g/L	25-45
GLU	5.13	mmol/L	4.11-7.94
PHOS	2.08	mmol/L	0.81-2.19
TBIL	2	umol/L	0-15
TP	66	g/L	52-82

胞学涂片, 使用 Diff-Quik 染色液进行染色, 并在显微镜下进行观察。在红细胞的背景中可见大量上皮细胞和间质细胞。上皮细胞呈现片状脱落, 核质比较高。细胞和细胞核表现出轻度的大小不等

收稿日期: 2016-12-01

作者简介: 叶镜岳(1977-), 男, 兽医讲师, 研究方向为小动物疾病学和微生物学, E-mail: 13740550@qq.com

(见图 2)。细胞质较少,呈嗜碱性染色。间质细胞边界不清,细胞和细胞核表现出中等程度的大小不等。细胞核为椭圆形,部分细胞核内可见明显核仁(见图 3)。间质细胞外存在大量嗜酸性基质(见图 4)。细胞学检查结果初步诊断为猫纤维腺瘤,但不排除其他乳腺肿瘤的可能性。建议进行病理组织活检。

4 病理活组织学检查

使用直径为 6 mm 的组织活检打孔器,对肿物进行活检(将图 5)。将活检组织放置于 10%的中性福尔马林中,进行组织病理学检查。可见腺管弥散性增生,周围可见水肿性纤维基质。腺管由 1-3 层分化良好的上皮细胞排列而成。周围梭形细胞边界分明,含有少量嗜酸性胞浆及 1 个胞核,诊断为乳腺纤维腺瘤。

5 治疗

对患猫进行子宫卵巢切除术,术后 1 个月,乳腺肿胀完全消退。

6 讨论

猫乳腺纤维腺瘤病,又称为乳腺纤维腺瘤样

改变,乳腺纤维上皮样增生,乳腺增生或纤维腺瘤综合征,是一种良性的乳腺疾病,在母猫或公猫身上一个或多个乳腺上发生的与孕酮有关的纤维腺体增殖。猫乳腺纤维腺瘤病的特征表现是在 2-5 个星期内,乳腺突然发生肿胀,通常会涉及到多个乳腺,最常见的乳腺结节大小从 1 cm³ 至 50 cm³ 不等^[1]。在慢性的病例中,由于乳腺增大或者创伤,乳腺可能发生溃疡和脓肿。其他的并发症包括乳腺皮肤的感染和由于增大的乳腺产生疼痛而导致短暂的厌食。

猫纤维腺瘤病可以发生于未绝育的母猫,怀孕的母猫以及接受孕酮治疗的母猫或公猫上。最常见于未绝育的年轻母猫上,但几乎可以发生于任何年龄,有报道的年龄范围为 6 个月至 13 岁。猫纤维腺瘤病通常在发情后的 1-2 周或者使用孕酮治疗后的 2-6 周内出现。目前并未发现明显的品种好发性。

临床上经常会因为患猫出现迅速增大的乳腺团块而就诊。主要的临床症状是出现肿胀、质地坚实的乳腺组织,可能是多个乳腺对称性的增大,也

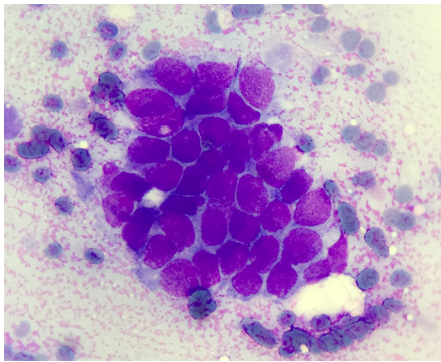


图 2 上皮细胞群落

细胞和细胞核表现出轻度大小不等,细胞质较少,呈现嗜碱性染色

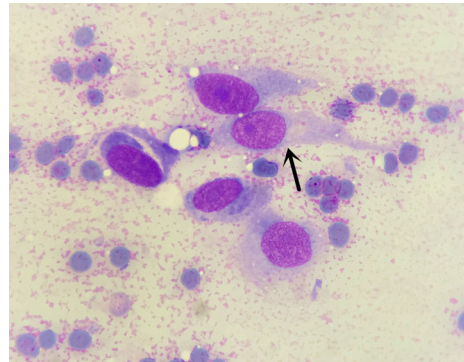


图 3 间质细胞边界不清晰

主要为梭形(箭头所指)或者不规则形;部分细胞核内可见明显的核仁

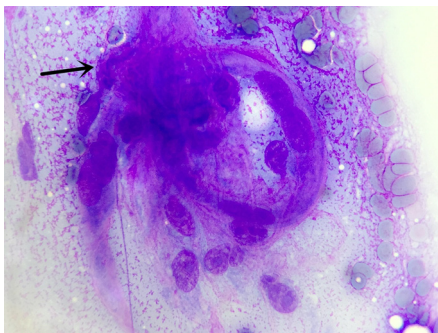


图 4 间质细胞外存在大量嗜酸性基质(箭头所指)



图 5 用活检器对乳腺组织进行活检打孔取样

可能是任何一个乳腺中出现单个的病灶。多个乳腺出现非对称性的增大,更经常见于未怀孕的母猫中,怀孕的母猫更倾向于出现均一的乳腺肿胀。由于乳腺严重增大,可能导致乳腺组织上的皮肤出现紧绷的状态;可能造成走动的困难和食欲的下降。无论乳腺如何增大,患纤维腺瘤病的怀孕母猫,在病变的乳腺中不会产生乳汁^[2]。患有纤维腺瘤病的猫,血液常规和血液生化检查通常无明显的改变。在发生乳房炎和溃疡的病例中,可能出现贫血,白细胞计数接近于正常范围的上限或及轻微上升。

可根据临床症状、病史做出初步诊断。猫纤维腺瘤的鉴别诊断包括其他乳腺增大、肿胀或者乳腺区域多肿块突起的情况,如乳腺炎、乳腺肿瘤、非肿瘤性乳腺组织的囊肿等。细针抽吸进行细胞学检查对诊断猫纤维腺瘤的诊断率不高,难以与良性和恶性的乳腺肿瘤病灶进行区分。在猫纤维腺瘤的病例中,对肿大的乳腺团块进行细针抽吸,经常可见上皮细胞,间质细胞与细胞外基质^[3];上皮细胞核质比相对较高,含有圆形的细胞核以及较小的核仁,少量细胞质呈现嗜碱性着染,上皮细胞群落表现出轻度的异型性^[4]。间质类型的细胞群落,细胞边界不清晰,通常表现出中等程度的细胞和细胞核大小不等。细胞核为椭圆形,含有一至两个核仁,细胞质呈现轻度嗜碱性着染。经常可见间质细胞外存在大量的嗜酸性基质。在猫的乳腺肿块病例中,如果出现上述典型的细胞学特征,结合符合的病症,临床病史,临床表现以及超声检查能够高度怀疑是纤维腺瘤病。确诊需对肿大的乳腺团块进行活组织检查。但是需要慎重考虑的是,严重增生的乳腺上方皮肤会变得紧绷(有时出现萎缩),因此活检的伤口有可能不愈合,进而变成一个并发症。

猫纤维腺瘤与孕酮相关,因此必须停止任何孕激素的治疗。建议对患病母猫进行绝育手术,为了避免对乳腺组织的伤害,绝育时建议采用侧切的手术通路而不是腹中线通路。通常而言,乳腺肿胀会在绝育后的3-4周内完全消退。如果动物对绝育或者药物治疗没有反应,可能需要考虑进行部分乳腺和全乳腺摘除,手术难度会比较大。研究表明孕酮受体拮抗剂阿来司酮能够成功的使纤维腺瘤病产生消退^[5-7]。阿来司酮是一种能够竞争性结合到孕酮受体的分子,分布在组织中不会激活荷尔蒙反应。尽管该药未被批准用于猫中,但是该药常用于人工流产或治疗子宫蓄脓。因此在使用

该药物之前,应该确保患猫没有怀孕。不同的文献对于阿来司酮的使用剂量和周期不尽相同,有文献建议,可以使用10 mg/kg剂量,在第1天和第3天进行皮下注射,一周后复查。如果有需要,可以重复使用上述疗程,很少情况需要使用到3个疗程。乳腺的体积,特别是乳腺厚度是评估对药物治疗是否有效的指标。

大部分的病例在绝育或者停止孕酮的使用之后会产生自发性消退。然而,当所有乳腺均迅速增生时,消退可能会比较缓慢,可能需要五个月甚至更长的时间才能使病灶全部消退。如果使用孕酮拮抗剂进行治疗,有可能在4-8周内消退。关于猫纤维腺瘤的复发是有争议的。有些文献称复发很罕见。但是有其他的文献报道,如果没有进行绝育,有可能在首次治疗之后的不同时间段内产生复发^[8]。如果不是用于繁殖,可以建议主人对该猫进行绝育。

参考文献:

- [1] Hayden D W, Johnston S J, Kiang D T, et al. Feline mammary hypertrophy/fibroadenoma complex: clinical and hormonal aspects [J]. *Am J Vet Res*, 1981, 42 (10): 1699-1703.
- [2] Görlinger S, Kooistra H S, van den Broek A, et al. Treatment of fibroadenomatous hyperplasia in cats with aglepristone [J]. *J Vet Intern Med*. 2002, 16 (6): 710-713.
- [3] Amy C V, Rick L C. Cowell And Tyler's Diagnostic Cytology And Hematology Of The Dog And Cat [M]. 4th edition. Elsevier Inc, 2014: 112-113.
- [4] Rose E R. Canine And Feline Cytology: A Color Atlas And Interpretation Guide [M], 3th edition. Elsevier, 2015: 315-316.
- [5] Sontas B H, Turna O, Ucmak M, et al. What is your diagnosis? Feline mammary fibroepithelial hyperplasia [J]. *J Small Anim Pract*. 2008, 49 (10): 545-547.
- [6] Leidinger E, Hooijberg E, Sick K, et al. Fibroepithelial hyperplasia in an entire male cat: cytologic and histopathological features [J]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 2011, 39 (3): 198-202.
- [7] Jurka P, Max A. Treatment of fibroadenomatosis in 14 cats with aglepristone changes in blood parameters and follow-up [J]. *Vet Rec*, 2009, 165: 657-660.
- [8] Loretta A P, Ilha M R S, Breitsameter I, et al. Clinical and pathological study of feline mammary fibroadenomatous change associated with depot medroxyprogesterone acetate therapy [J]. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2004, 56 (2): 270-274.

一例犬大泡性角膜炎的诊治

祁生奎

(瑞鹏宠物医院, 广东 广州 511400)

中图分类号: S858.292

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0044-02

犬原发性大泡性角膜炎是以基质形成大泡为主要病理特征的角膜疾病,其主要原因是内皮细胞营养障碍,泡内积液导致角膜水肿,进而影响视力,当病变波及到上皮细胞或者发展成角膜溃疡时,会造成疼痛。角膜热成形术是通过热量使角膜基质胶原萎缩、阻止液体进一步蓄积的手术方法,本文以一例吉娃娃大泡性角膜炎诊治过程,介绍角膜热成形术的临床应用。

1 基本情况

吉娃娃,10岁龄,雌性,已免疫,未驱虫。患犬一直以狗粮为食,左眼长期分泌大量的脓性分泌物,眼球颜色浑浊,并且肿胀,右眼无明显异常。在其他医院已治疗约两年,无明显好转,近日恶化,前来就诊。

2 检查

2.1 临床检查

体温 39.1℃, 体重 3.15 kg, 心率 110 次/分,呼吸 30 次/分。可是粘膜粉红,CRT 小于 2s。被毛光亮,触诊皮肤有弹性,体型匀称。

2.2 实验室检查

2.2.1 血常规检查 (CBC) 血常规结果提示白细胞总数轻微偏高,其余无明显异常(见表 1)。

2.2.2 生化检查 生化检查结果显示该患犬的各项生化指标均在参考范围内,无明显异常(见表 2)。

2.2.3 基本眼科检查 眼科外观检查显示该犬左眼具有较厚、弥漫性的角膜水肿(见图 1、2),进一步检查结果见表 3。

3 诊断

结合临床症状及辅助检查诊断为大泡性角膜炎。

表 1 血常规检查结果

项目	检测值	参考值
WBC	17.2×10 ³ /uL	6.0~17.0
RBC	5.92×10 ⁶ /uL	5.5~8.5
HGB	15g/dL	11.0~19.0
HCT	45.5%	39~56
MCH	21.8pg	19~24.5
MCV	68fL	62~77
MCHC	32g/dL	30~38
PLT	203×10 ³ /uL	117~460
LYM%	20.5%	12~30
OTHR%	68.8%	60~83
EO%	3.8%	2~10
LYM#	3.2×10 ³ /uL	0.8~5.1
OTHR#	5.9×10 ³ /uL	4.0~12.6
EO#	2×10 ³ /uL	

表 2 生化检查结果

项目	检测值	参考值
GLU	5.92mmol/L	4.11~7.95
UREA	2.8mmol/L	2.5~9.6
CREA	64umol/L	44~159
BUN/CREA	10	
PHOS	1.18mmol/L	0.81~2.20
CA	2.28mmol/L	1.98~3.00
TP	62g/L	52~82
ALB	32g/L	23~40
GLOB	30g/L	25~46
ALB/GLOB	1.1	
ALT	47U/L	10~125
ALKP	69U/L	23~212
GGT	1U/L	0~11
TBIL	2umol/L	0~15
CHOL	3.55mmol/L	2.84~8.26

收稿日期: 2016-12-01

作者简介: 祁生奎, 男, 执业兽医师, Email: qisk@rp-pet.cn



图 1 患眼正面



图 2 患眼侧面

表 3 眼科检查结果

项目	左眼 (OS)	右眼 (OD)
眼球大小	正常	正常
眼球运动	正常	正常
眼球位置	正常	正常
按压眼球	疼痛	正常
威胁反射	弱	正常
炫目反射	弱	正常
瞳孔对光的反射	弱	正常
泪液测试	16	17
荧光素检查	阳性	阴性
眼压测量	17mmHg	21mmHg
裂隙灯检查	上皮细胞大泡	正常
检眼镜检查	角膜后方无法检查	正常

4 治疗

采用角膜热成形术瞬膜遮盖治疗。全身麻醉后,使用开眼器撑开眼睑,使用无菌棉签蘸取0.5%聚维酮碘溶液对眼睑、结膜、角膜进行消毒(见图3),使用钝的外科手术刀将眼球异色边缘2~4 mm角膜上皮清除(见图4)。然后再使用一次

性电凝刀保持一个平稳的角度,进行网格状的表面灼烧,完成热成形术(见图5)。术后,局部使用广谱抗生素和散瞳药(1%阿托品),同时使用A-派克眼膏、速高睫促进角膜愈合与消炎,使用5%NaCl促水肿消退。

5 小结与体会

在特定的品种如波士顿梗或者老年犬中,角膜内皮功能衰退会导致严重的角膜水肿,随着角膜水肿的持续发展,角膜上皮内液体可迅速聚集,形成不同大小的角膜上皮水泡。角膜热成形术使先前基质层的胶原纤维连接,形成平坦的角膜,同时造成的瘢痕组织在水肿的角膜表面形成稳固的屏障,该手术并不能使角膜完全恢复清澈透明,但是可以防止水肿和大泡的进一步形成,阻止周期性角膜溃烂带来的疼痛。

关于大泡性角膜炎病例预后,2周后拆除遮盖检查角膜,若角膜上皮重建,透明化良好,无复发水疱、疼痛,可局部使用皮脂类固醇最小化瘢痕;若水疱复发、疼痛,需进行结膜瓣遮盖术。本病例术后可见角膜轻微的瘢痕化,无复发的水疱、溃疡,未见动物疼痛,恢复良好。

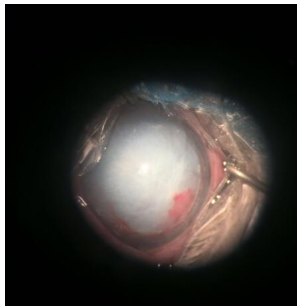
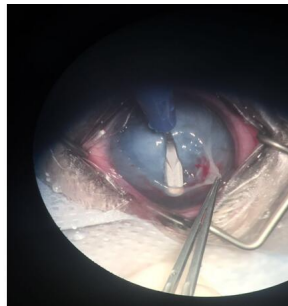


图 3 术眼消毒图



4 清除角膜上皮

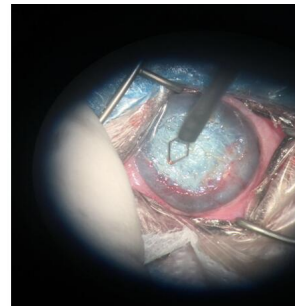


图 5 热成形术

冀鲁豫三省交界地区奶牛消化道主要寄生虫流行情况调查及综合防控

刘承军^{1*}, 刘凤辉², 王海丽³

(1. 聊城市畜牧兽医技术服务中心, 山东 聊城 252000; 2. 青岛康地恩动物药业有限公司, 山东 青岛 262111; 3. 聊城职业技术学院, 山东 聊城 252000)

摘要: 为了解河北、山东、河南三省交界地区部分市奶牛消化道主要寄生虫病感染情况, 2015年4月下旬至11月上旬, 笔者一行对山东省聊城、菏泽、濮阳、邢台的部分县奶牛的消化道主要寄生虫病进行了系统地调查和总结, 病分析了流行特点, 制定了防治措施。结果显示, 冀鲁豫三省交界地区奶牛消化道主要寄生虫有球虫类、线虫类、吸虫类和曲子宫绦虫类共9种寄生虫, 不同自然环境、不同饲养规模的牛的寄生虫感染率不同。临床上应采取加强驱虫, 加强消毒, 提高牛的饲养水平等措施, 减少寄生虫病的流行和发生。

关键词: 奶牛; 寄生虫; 调查; 防控

中图分类号: S855.91

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0046-02

河北、河南、山东三省交界地区是我国重要的商品粮生产基地, 近年来, 该地区畜牧业发展较快, 各类畜禽饲养量逐年增加, 特别是奶牛存栏接近15万头, 成为三省重要的奶源基地。但是, 受经济发展情况的限制, 该地区散养奶牛仍占很大比例, 因饲养条件相对较差, 很容易造成寄生虫病的发生和流行。为摸清三省交界地区奶牛寄生虫的流行及感染状况, 笔者通过调查并结合临床经验, 做了如下分析。

1 材料和方法

1.1 调查的对象

2015年4-11月, 根据三省交界地区奶牛养殖规模、养殖聚集的区域等特点, 选择山东的单县、临清、阳谷、莘县四县, 河北的馆陶、临西两县, 河南的范县、台前两县, 合计8个县的763头不同饲养规模的奶牛进行了流行病学调查, 其中母牛413头, 公牛412头; 犊牛268头, 成年牛557头。

1.2 样品的采集

通过肛门直肠采取少量粪便的样品, 并将所采取的样品分别编号后轻轻放入干净透明的样品袋中, 样品袋外要注明采集样品的时间以及采集

样品的地点、牛的品种、年龄等, 最后将采集好的样品放置到4℃冰箱保存、备用。

1.3 试验器材及试剂

样品袋、手术镊、手术剪、挑虫针、平皿、青霉素瓶、普通光学显微镜、载玻片、盖玻片、目镜测微尺、物镜测微尺、巴氏液^[1]。

1.4 检查方法

饱和盐水漂浮法; 虫卵计数法^[2], 虫卵的计数采用常规用麦克马斯特氏法进行计数, 计算出每克牛粪中的虫卵(卵囊)数量^[3]。

1.5 数据处理

试验数据用SAS处理软件做方差。

2 结果与分析

2.1 三省交界地区牛寄生虫感染情况

这次调查共采集了牛样品763份, 通过检测发现, 肝片吸虫36例, 球虫虫卵47例, 华支睾吸虫31例, 食道吸虫20例, 阔盘吸虫15例, 新蛔虫33例, 尖刺线虫14例, 丝状吸虫16例, 曲子宫绦虫15例, 共计227例, 其中球虫占20.7%, 线虫占27.8%, 吸虫占36.1%, 绦虫占6.6%。此外还发现了个别牛存在牛疥螨、牛硬蜱等体表寄生虫。检测结

收稿日期: 2016-12-10

作者简介: 刘承军, 男, 本科学历, 学士, 高级兽医师。E-mail: 18863029296@163.com

*: 通讯作者

果见表。从表 1 来看,通过检测我们发现鲁西地区牛寄生虫存在以下几个特点:

2.1.1 具有明显的区域性,靠近徒骇河、马颊河等水网较密集的区域,的县市因水草繁密,利于各类吸虫的中间宿主的生长与繁殖,吸虫感染较为严重;其他县市因气候干燥,球虫类、线虫类较为明显。

2.1.2 与地方气温、气候具有较为紧密的关系。三省交界地区属于温带季风气候区,具有显著的季节变化和季风气候特征,夏季适合各类中间寄生虫的中间宿主生存和繁殖,也为各类虫卵提供了良好的发育环境,有利于各类寄生虫繁殖、存在。冬季寄生虫发病相对较少。

2.1.3 落后的饲养管理模式是寄生虫流行的助推器。长期放牧滋生了寄生虫感染奶牛的机会,管理方式落后,营养水平不高降低了牛只的抵抗力,极易诱发疾病。

2.1.4 混合感染较为普遍,调查的总体情况来看,该地区规模奶牛场与散养户均有混合感染的现象,混合感染率分别为 24.5% (187/763)、5.2% (40/763)。特别是散养奶牛混合感染严重,2 岁以上的奶牛混合感染严重。

2.2 不同情况养殖奶牛球虫感染情况

本次采集的 763 份样品中,球虫感染 47 份,

占总采集样品的 6.1%,其中规模养殖场的奶牛发现 12 头感染球虫,感染率为 1.6%,散养奶牛球虫感染率占 4.5%;散养奶牛球虫感染率明显高于规模养殖场。另外,2 岁以下的牛球虫感染了为 41 例,2 岁以上的奶牛没有发现虫感染,这说明,球虫主要感染 2 岁以下的奶牛发病。

2.3 不同情况养殖的奶牛线虫感染情况

本次采集的 763 份样品中,线虫感染了 83 份,占采集样品总数的 10.9%,其中规模养殖场奶牛发现 25 头感染线虫,占样品总数的 3.3%,散养奶牛 58 头感染,占 7.6%,散养奶牛线虫感染率明显高于规模养殖场的牛。1 岁以内的奶牛没有发现线虫感染,1 岁以上的奶牛发现线虫感染 45 例,这说明线虫主要感染 1 岁以上的奶牛,犊牛很少感染。

2.4 不同情况养殖的奶牛吸虫感染情况

本次采集的 763 份样品中,感染吸虫的为 82 例,占采集样品总数的 10.7%,说明吸虫感染率较其他寄生虫病感染率较高,其中规模养殖场发现 15 例吸虫感染,占样品总数的 2.0%,散养牛感染 67 例,占样品总数的 8.8%,散养奶牛吸虫病发病率明显高于规模养殖场,1 岁内犊牛感染了 30 例,占样品总数的 3.9%,1-2 岁牛感染 27 例,感染率 3.5%,2 岁以上牛感染 25 例,感染率 3.2%,通

表 1 鲁西地区牛寄生虫检测情况

县(市区)	检验头数	检验结果								
		球虫	线虫卵				吸虫卵			曲子宫 绦虫
			尖刺线虫	新蛔虫	丝状线虫	食道线虫	肝片吸虫	阔盘吸虫	华支睾吸虫	
莘县	118	8	3	6	1	0	3	0	4	1
临清	96	6	1	7	3	3	5	2	6	2
阳谷	80	1	0	5	5	1	8	0	7	1
单县	91	6	3	2	1	2	4	1	3	1
馆陶	68	7	1	3	2	3	6	0	2	3
临西	75	6	0	5	1	4	2	2	3	2
范县	128	8	4	3	0	2	4	6	2	1
台前	107	5	2	2	3	5	4	4	4	4
合计	763	47	14	33	16	20	36	15	31	15

(下转第 52 页)

购羊与运输过程中的注意事项

郭丙全, 车晓囡, 连伟民, 张义元

(山东省聊城市畜牧兽医局, 山东 聊城 252000)

中图分类号: S851.2

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0048-02

近几年来,聊城市畜牧业迅速发展,特别是羊产业发展势头持续增强,导致很多人产生了从事养羊行业的念头。但是部分养殖者对进羊场所、申报检疫、选羊、运羊、落地报告等需要注意的事项了解不深入不透彻,造成羊购入后出现一系列的问题,甚至发生动物疫病,有时给养殖者带来巨大经济损失。为了使养殖者全面了解从购羊到落地进场后的注意事项,尽量减少经济损失,结合自己的工作实际探讨以下几个方面的问题。

1 购羊场所

1.1 活羊交易市场。羊只的来源途径复杂、地点不明,来源区域广泛,部分羊只未依法经过检疫进入交易市场,其中极易带有处于传染病潜伏期的羊,经过交易市场混群、出售运往外地,无形中给传播动物疫病带来了很大隐患,且所提供的羊品种质量难免良莠不齐,售后服务没有保证,购羊后一旦发生经济纠纷或发生动物疫病,很难在短时间内解决问题,进而损害购羊者的经济利益。

1.2 规模养殖场。选择养羊场的时候,不要只关注价格的高低,而应该着重考虑场家诚信度和品种的质量以及售后服务能力。同时还要查看是否具有工商营业执照、动物防疫条件合格证等证件,选择种羊场时还要查看种畜禽生产经营许可证,判断其是否是证件齐全的正规养殖场。正规养殖场各方面管理规范,档案材料记录齐全,羊的质量和售后服务有保障,若有质量问题容易追溯和解决。

建议广大养殖者购羊时选择各种证件齐全的正正规养羊场,尽量不要选择活羊交易市场,以降低由于购羊产生纠纷和疫病传播的风险。

2 购羊季节及选羊

2.1 时间、距离和纬度。买羊最好在春秋季节气候变化较小的时候,购羊最好遵循就近原则,去远处买要选择纬度和气候地理条件比较接近,这样才能从根本上减少应激反应和后续的风土驯化问题。

2.2 年龄。买羊不要买太小的羊,最好选择5-6月龄育成羊,因为羔羊一般2-3个月断奶,断奶应激反应很大,几乎在断奶后一个月不长(很多养殖户不会断奶过渡),到第六个月才正常(成年的母羊一般是经过产羔选择的,多数卖家都会把不孕的、泌乳差的、繁殖率低的、保姆性不好的卖掉,而这些情况不是专业的人员又不好分辨)。到场饲喂1-2个月正好发情配种为宜,湖羊、小尾寒羊等多胎羊的初配年龄也在6-8月龄,不宜过早。

2.3 健康状况。选羊时要细心,确保羊只健康。千万不要在疫区进羊,看看有没有羊痘、疥螨、口疮、肺炎、乳房炎、关节炎、结膜炎、脓胞和身体缺陷(牙齿磨灭不整、短下颚、小奶头、老坡蹄、前胸窄、斜尻、瞎眼、瘸腿、X或者O型腿、外阴内凹等等)。问清楚当地的疫病情况,包括传染病和寄生虫病,以及其他畜种的疫病情况,以做好有针对性的防治。

2.4 精选。繁殖用母羊要精选,母羊要膘情适中、整体由前向后呈楔形(母性好)、宽腰大腓(产羔大)、大奶头软而匀称(泌乳能力强),头型清秀(性格温顺),大嘴叉(采食能力强),大鼻孔(肺活量大,有鼻窝的前胸必开阔),眼睛大(发情明显),眼有神(体质健),泪窝深(品种纯正,吸热护眼),耳灵活(反应机敏),颈适中(屠宰率高),背腰平直(屠宰出成率高),好身腰(出生重大),好肚腹(食

欲旺盛),好毛眼(胃肠消化吸收好),站蹄且蹄质坚硬,肢势端正。

3 运羊前准备

3.1 检疫审批。跨省购进种羊时,需在调运前30-60天内向输入地省级动物卫生监督机构申报,经审核批准后,方可购进。运输羊只离开产地前,畜主应当提前向所在县级动物卫生监督所或动物检疫申报点申报检疫。经检疫合格取得《动物检疫合格证明》后,方可运输羊只离开产地,否则不得离开。运输商品羊需提前3天申报检疫,运输种羊需提前15天申报检疫,买主需凭有效的《动物检疫合格证明》运输羊只。

3.2 天气。运输前要看好天气,季节最好选择不冷不热的时候,气候变化较少,避免雨雪大风等天气,沿途所路过的地域天气情况,道路情况和消毒检疫要求等要提前知晓。

3.3 消毒。装羊前的车辆要严格消毒,特别是经常拉羊的车本身可能就是一个传染源,用5%~10%的热火碱水、汽油喷灯和百毒杀等彻底消毒干净;用百毒杀消毒液带羊消毒。

3.4 装车前准备。检查车况和询问司机;羊一定要喂半饱且要以粗饲草为主;注射黄芪多糖等抗应激药物;饮水加电解多维和益生菌。

4 运羊

4.1 装羊。长途运输又不能在途中饲喂的情况下,尽量要把足够的干草作为垫草;不要过于拥挤,规模要适当,超过24小时的运距最好采取趴卧式小隔栏,低于24小时运距的可以采取站立式运羊;装羊前每只羊注射黄芪多糖注射液10 mL;把过渡期7天用的饲草料、当地干净土和必备的药品带好。

4.2 途中。司机开车要轻启动、慢拐弯、缓刹车。上路下路检查一下羊,特别是站立式装羊并且在颠簸路上走的更要注意检查。半路要饮水,给予干草。运输前、运输过程中及到达目的地后,饮水中要添加电解多维,夏季太热加藿香正气水,运输距离超远加适量强心剂饮水。

5 运到目的地所采取的措施

5.1 运到后先给予少量当地干草,3小时后饮

水;喂饲料要和来源地保持一致;由少到多逐渐添加,7天后过渡到正常本场饲喂方法;用当地的灶膛土+产地带来的土放在锅里煮开,水凉后放进饮水槽,促进风土驯化(羔羊饮水要在一桶水约14 kg中加入1支庆大霉素+4支维生素C+1支樟脑磺酸钠);饮食差的羊灌服益生菌,分别注射黄芪多糖+安痛定+复合维生素B+适量的青霉素G钠,或者针对当地的疫病流行情况和具体羊病确定;稳定7天后按照当地的防疫程序做好相关防疫工作。

5.2 卸羊后的运载车辆要严格进行彻底消毒(消毒方法同第3.3)。

5.3 落地报告及隔离观察。跨省购进的商品(种)羊入场24 h内,应向所在县级动物卫生监督机构报告,并接受监督检查。种羊并在县级动物卫生监督机构的监督下,于饲养场内的隔离舍进行隔离观察30天。经隔离观察合格的方可混群饲养;不合格的,按照国家有关规定进行处理。

6 违法违规需承担的责任

6.1 跨省购进用于饲养的商品羊入场后,未向所在地动物卫生监督机构报告的,由动物卫生监督机构处五百元以上二千元以下罚款。

6.2 跨省购进种用羊入场后,未按规定进行隔离观察的,由动物卫生监督机构责令改正,处二千元以上一万元以下罚款。

6.3 运输的羊只未附有检疫证明,由动物卫生监督机构责令改正,处同类检疫合格动物、动物产品货值金额百分之十以上百分之五十以下罚款;对货主以外的承运人处运输费用一倍以上三倍以下罚款。

6.4 运载羊的车辆在装载前和卸载后没有及时清洗、消毒的,由动物卫生监督机构责令改正,给予警告;拒不改正的,由动物卫生监督机构代作处理,所需处理费用由违法行为人承担,可以处一千元以下罚款。

6.5 未办理审批手续,跨省购进种用羊的,由动物卫生监督机构责令改正,处一千元以上一万元以下罚款;情节严重的,处一万元以上十万元以下罚款。

中药添加剂作为兽药的安全影响因素探讨

廖味光, 李毅财

(来宾市动物疫病预防控制中心, 广西 来宾 546100)

摘要: 对中药添加剂作为兽药在使用过程中出现的影响畜产品质量安全的主要因素进行综述, 指出树立正确的中药使用观念, 深入开展中药毒理学的相关研究, 切实保障畜牧业健康发展

关键词: 中草药; 添加剂; 兽药安全; 因素

中图分类号: S853.7

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2017)01-0050-03

兽药(Veterinary drug)是指在畜禽动物生产过程中为维持动物生长发育、防治疾病或生产性能而使用的药物及其制品。据世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)报告显示,食品中兽药残留约有120种,兽药主要分为抗生素类、激素类、驱虫药等^[1],而抗生素类药物是主要的兽药添加剂,占兽药用量的60%^[2]。兽药残留(Veterinary drug residue)指动物使用药物后在细胞、组织或器官内的药物、代谢物和其他药物形态等^[3]。大量使用兽药,不仅影响畜产品品质和安全性,而且兽药残留还损害广大消费者的身体健康。由于抗生素、激素及化学合成添加剂不合理的使用,导致畜产品质量存在较大的安全隐患,食品的安全性也受到消费者质疑。目前,利用中药开发的具有安全、有效、低毒的新型药物添加剂具有巨大的市场需求。

中药(Traditional Chinese Medicine,TCM)的历史悠久,是在中医独特的理论体系指导下用于预防、诊断、治疗疾病或调节人体生理机能的药物,主要来源多为植物,少部分为动物、矿物及生物制品^[4]。我国中药文献中记载在册的中药大概有3 000多种,而且大多数来自于野生的动、植物,以自然炮制法^[5]保留它们的自然结构和生物活性而制成,是经人、动物长期使用、筛选下来的具治疗和保健作用的食物(药食同源)。中药添加剂(Chinese Herbal Addictives)在现代分析技术的指导下,以动物营养学为生物基础和现代饲

料工业等现代工程技术体系为支撑,制备出的药品具有毒性低、残留少、不易产生耐药性、来源广、价格低的特点。但中药及其添加剂与动物兽药安全的关系及潜在危害值得研究人员深入研究。我们应当对中药添加剂持审慎态度,特别是要加强对中药毒理学的基础研究。下面就中药作为兽药对影响畜产品质量安全的几个因素进行探讨,以提高对中药添加剂使用的安全认识。

1 中药的外源毒性

1.1 重金属残留

中药中重金属元素残留主要有两种,一种是以治疗为目的,添加含有重金属的药物,如朱砂(HgS),具有清心安神,扶正祛邪的功效;雄黄(As₂O₃)能解毒杀虫,燥湿祛痰等。张丽娟^[6]在研究中指出,小鼠在3个半月里服用大剂量朱砂制剂后,汞在体内分布规律为:肾脏>肝脏>血液。房圣民等^[7]对雄黄在兔体内的吸收与分布研究表明,As₂O₃主要分布在肝与脾脏,家兔连续7 d用药后,As₂O₃在肝中的蓄积量为0.632 mg。中药中重金属元素残留的另一种情况来源于中药材生长所需要的自然环境(包括空气、土壤、水)、种植过程中长期施用的农药、化肥和除草剂等,以及在加工过程中偶然受到重金属元素污染。

1.2 农药残留

在种植过程中,中药的农药残留和超标现象具有广泛性,采收的成品严重影响中药的质量、安全性和防治效果,尤其是有机氯农药残留最为突

出。根据对 122 种中药材 1 250 份样品的监测结果表明, 中药材中有机氯农药残留检出率达 90% 以上, 且个别药材中六六六或滴滴涕残留超标非常严重^[8]。据报道, 具有清热解毒、散热疏风作用的金银花在种植过程中滥用化学农药, 对 87 种金银花样品检测 50 种农药, 检出率较高的为氯氰菊酯、三唑醇和三氯杀螨醇^[9]。因此, 应该对药品产量和用量大、使用农药历史长、病虫害发生严重的药材进行重点监测, 尤其加强检测有机氯类农药残留情况。

2 中药兽药残留的影响

2.1 有益作用

中药兽药残留的有益作用主要是可以提高畜禽产品的外观或者肤色, 如通过喂食野菊花、桅子、红辣椒等有天然色素的物质, 可蓄积在动物的皮肤、蛋黄、肌肉中, 改善皮肤及产品的颜色, 提高产品的经济附加值。根据《饲料添加剂品种目录(2013)》的规定, 在水产动物中可以添加天然叶黄素(来源于万寿菊)作为增色剂。王鲁波等^[10]研究不同天然叶黄素(来源于源自万寿菊, 含量为 4.64%) 的添加水平对黄颡鱼生长和皮肤着色的影响, 结果表明, 添加量为 24.2~1 700 mg/kg 的天然叶黄素能够增加黄颡鱼的生长速度, 最适剂量为 76.25 mg/kg 饲料。此外, 可改善动物肉的风味、品质。胡忠泽等^[11]研究表明, 复方中草药添加剂能够提高肉鸡的胸肌率、腿肌率、瘦肉率、系水力等品质因素, 改善鸡肉的肉质。

2.2 有害作用

中药通过喂食后, 在动物体内产生各种药物或者代谢产物, 可蓄积在动物体内, 对动物的内脏, 特别是肝、肾等主导代谢的器官造成损伤, 同时残留在肌肉等可食用部位, 若畜禽饲喂量大, 人食用后通过食物链的作用可能产生较大的毒性反应。例如断肠草, 又名钩吻、胡蔓草等, 古时称“猪人参”, 其根、茎、叶富含钩吻碱素, 具有消积、杀虫及健胃的功效, 还可以作用于动物的神经系统, 对家畜有镇静催眠作用, 减少动物的运动消耗, 增加饲料适口性, 有较强的促进生长作用^[12]。但目前对于食用喂有断肠草的动物产品的安全性研究较少, 须慎重对待。矿物类中药如雄黄、朱砂等, 长期饲喂后, 重金属残留在动物肌肉和肝、肾等内脏

中, 也会对消费者产生潜在的危害。

3 中药的毒副作用

3.1 中药自有毒性

一直以来, 人们认为天然的就是最好的、最自然的, 容易产生“中药副作用少”的错误观点。随着科学的进步, 一些中草药及成分的毒副作用逐渐被报道。比利时的 Nortier 等^[13]提出“中草药致肾病”的学术概念, 导致马兜铃、木通、青木香等数十种含马兜铃酸的中草药和相关中成药如八正丸、龙胆泻肝丸、冠心苏合丸等在美国应用受阻。丁晓霜等^[14]在研究关木通对肾脏毒性中指出马兜铃酸是主要的致肾毒成分。关木通不仅有明显的肾脏毒性, 还有肝脏毒性, 而且致肾毒剂量较低。这给我们敲响了警钟, 不能总认为中药是无毒的, “是药三分毒”, 我们必须树立新的药物用药观。

3.2 “三致”作用

赵军宁^[14]研究表明, 虽然大黄毒性很低, 但是长期或大剂量使用时应注意其对消化系统、免疫系统的毒副作用。大黄的致突/致癌作用值得进一步研究。国际肿瘤研究中心(IARC)根据致癌程度的不同将黄樟素划分为第二级 B 类属于可能致癌物质, 与汽油发动机排放的尾气、人类免疫缺陷病毒 2 型等同一个等级。黄樟素较多地存在于含挥发油成分的中药中, 如杜衡、香樟、八角、茵香、桂皮、猴樟、樟木、樟脑等。研究发现, 黄樟素对动物有致癌性, 在饲料中添加 100~500 mg/kg 黄樟素喂养两年的大鼠, 均出现不同程度的生长抑制、睾丸和胃萎缩, 出现单个或多个肝细胞癌瘤^[15]。因此, 国外均已禁止黄樟素及其衍生物作为添加剂在食品中应用。

4 结语

中草药安全研究内容十分广博, 涉及学科门类多, 研究所需仪器设备昂贵, 大多数需要使用光谱、色谱、质谱技术及结构分析(核磁共振、X-衍射等)技术, 结合生命科学技术(生物标记技术、基因技术等)才能系统地了解从药物本源到作用于生物体的危害因素影响, 推进中草药的研究进步。加强中草药兽药安全的研究, 对于保护民族医药, 促进人民健康具有十分重要的意义。

参考文献:

[1] Hurtt M E, Cappon G D, et al. Proposal for a tiered approach to developmental toxicity testing for veterinary pharmaceutical products for food-producing animal [J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41:611-619.

[2] 冯忠武. 兽药与动物性食品安全[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(9):7-20.

[3] 陈一资, 胡滨. 动物性食品中兽药残留的危害及其原因分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2):162-166.

[4] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.

[5] 兰晔, 殷军. 中药制剂在猪病防控中的实践[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2015, 31(11):227.

[6] 张丽娟. 中药中重金属元素[D]. 北京: 首都师范大学, 2004.

[7] 房圣民, 佟如新, 尤献民, 等. 人服用含矿物药雄黄复方制剂中As₂₀₃的体内吸收与分布[J]. 中成药, 1989, 11(11):8.

[8] 薛健, 金红宇, 田金改, 等. 中药农药残留问题研究与思考

[J]. 中草药, 2007, 38(10):1578-1581.

[9] 李辉, 宋淑荣, 张宇娇, 等. 金银花农药残留现状分析及合理使用建议[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(5):1057-1059.

[10] 王鲁波, 薛敏, 王嘉, 等. 天然叶黄素对黄颡鱼生长性能和皮肤着色的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(7):1102-1110.

[11] 胡忠泽, 朱辉, 李敏娜. 复方中草药添加剂对肉鸡肉质的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2005(9):37-39.

[12] 皱光贤, 刘小兵. “猪人参”- 有待开发的饲料添加剂[J]. 兽药饲料添加剂, 1996(3):39.

[13] Nortier J L, Martinez M C, Schmeiser H H, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Asisrolochia fangchi) [J]. Neng J med, 2000, 342(23):81-86.

[14] 赵宁军, 王晓东. 大黄毒理学研究进展[J]. 中医药学报, 1990, 5:48-50.

[15] 赵宁军. 中药致癌性研究近况[J]. 西北药学杂志, 1988, 3(3):35-37.



(上接第 47 页)

过统计学计算,三者差异不显著,说明各个年龄段的奶牛都易感染吸虫。

3 防治要点

3.1 做好驱虫工作。结合地方实际,合理选择药物, 定期开展驱虫是做好奶牛寄生虫防控工作的重要环节,临床上可采取喂服、注射的方式祛除虫体,使虫卵不能发育或者感染;从驱虫目的来分,可分为预防性的驱虫与治疗性驱虫,预防性驱虫主要指要做好定期驱虫工作,合理选择驱虫时间,杀死虫卵,防止虫体感染与蔓延;治疗性驱虫主要指发生寄生虫病的牛使用合理的药物进行驱虫,达到保健的作用,驱虫药物的选择应以广谱高效、低毒安全、使用方便为原则^[4]。临床上驱虫药物主要有伊维菌素、阿维菌素、吡喹酮、硝氯酚、丙硫苯咪唑等高效低毒的药物。

3.2 加强对外界环境的消毒。要科学制定消毒制度、消毒程序,合理选择消毒药品,加强对畜舍及

周边环境的消毒,坚持使用两种以上消毒药品交叉消毒,防治产生耐药性。要特别是要做好饲养器具的消毒,消灭和处理好中间宿主和传染途径,阻断牛与寄生虫接触的机会。

3.3 科学饲养,合理使用疫苗预防,饲喂全价饲料,调整饲料的结构,适当补充精料以及必需氨基酸等饲料添加剂,减少感染的机会;要坚持幼牛与成年牛应分开饲养。要做好粪便的处理,及时对动物粪便进行发酵,杀死虫卵和幼虫。

参考文献:

[1] 何贵业, 祁守忠. 化隆县牛羊寄生虫区系调查[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2013(4):26-28.

[2] 汪明. 兽医寄生虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003:345-348.

[3] 秦建华, 李国清. 动物寄生虫病学实验教程[M]. 中国农业出版社 2007:6-10.

[4] 黄德生. 云南省牛寄生虫与寄生虫病的防治[J]. 云南畜牧兽医, 1999:10-14.