

双月刊 1976年3月创刊

第38卷第2期 (总第168期)

2013年4月18日出版

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

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 陈琴芬 舒鼎铭

孙彦伟 王贵平 蔡建平 王政富

刘彩霞 熊惠军 吴玄光 刘清神

特邀编委:

陈 峰 谢志刚 林旭桢 李 岩

陈瑞爱 罗满林 黄旭钊 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊将一次性支付作者著作权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

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

目 录

·畜牧技术·

不同季节配种对大约克母猪繁殖性能的影响分析..... 陈绍孟, 魏郑谊, 等(1)

影响猪常温精液品质的因素分析.....李凤霞, 刘建营(4)

壳聚糖对獭兔生产性能的影响研究.....张亚平(6)

·兽医临床·

一株新城疫病毒广东分离株的遗传关系分析..... 贾伟新, 谢淑敏(9)

一起猪附红细胞体病的诊治..... 阳玉彪(12)

猪场病原检验方法的应用分析与建议.....朱秀高(14)

·试验研究·

猪流行性腹泻病毒S蛋白抗原表位区基因克隆、分析及原核表达.....

.....肖建雄, 唐志玲, 等(17)

检测猪乙型脑炎抗体胶体金免疫层析法的建立与初步应用.....

.....田纯见, 贾 坤, 等(21)

利用手工克隆技术培育体细胞克隆莱芜猪.....周 荣, 周 秀, 等(26)

生态化放牧与养殖结合养猪路径研究.....由建勋(30)

·华南宠物园地·

犬瘟热病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用.....

.....余绍华, 罗满林, 等(35)

犬附红细胞体病例分析.....谢金富, 张 洋(40)

·经验交流·

兽医微生物学与免疫学实验综合教学体系的构建.....罗永文, 郭慧霞, 等(44)

当前我国生猪产业现状及后期走势判断.....王明富(48)

兽用生物制品实验动物福利初探..... 盘伟岚, 黄丽萍, 等(51)

·信息之窗·

2013“永顺杯”优秀论文评选启事..... (39)

欢迎订阅本刊..... (52)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2013 Volume 38,Number 2 (Total No.168)

Main Content

- Influence of mating in different seasons on reproductive performance of Large Yorkshire sows*
.....Chen Shaomeng,Wei Zhenyi, et al(1)
- Effects of Chitosan on the performance in Rex Rabbit* Zhang Yaping(6)
- Phylogenetic analysis of a Newcastle disease virus strain isolated from Guangdong*.....
.....Jia Weixin, Xie Shumin(9)
- Cloning and expression of antigen epitopes of spike protein of porcine epidemic diarrhea virus*
.....Xiao Jianxiong,Tang Zhiling,et al (17)
- The GICA method for detection of porcine Japanese B encephalitis antibody*.....
.....Tian Chunjian, Jia Kun, et al(21)
- Breeding of Laiwu pig by handmade cloning*Zhou Rong,Zhou Xiu,et al(26)
- Real-time RT-PCR method for detection of canine distemper virus and application*
.....Yu Shaohua, Luo Manlin,et al(35)
- Analysis of Canine Eperythrozoonosis Cases*.....Xie Jinfu, Zhang Yang(40)
- A comprehensive teaching system of veterinary microbiology and immunology experiment*
.....Luo Yongwen, Guo Huixia,et al (44)
- Outlook of pig industry in China*.....Wang Mingfu(48)
- Animal welfare of experimental animals used in production of veterinary bio-agents*
.....Pan Weilan,Huang Liping, et al(51)



Sponsored by:Guangdong Association of Animal Husbandry
and Veterinary Medicine,Institute of Animal
Science and Institute of Vererinary Medicine,
GuangdongAcademyof AgriculturalSciences.

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

E-mail:gdxmsy@163.com gdxmsykj@163.com

不同季节配种对大约克母猪繁殖性能的影响分析

陈绍孟, 魏郑谊, 周婉珠, 张晓锋

(浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 对1 532头大约克母猪断奶后第一次配种的繁殖记录, 按不同季节分析。结果表明, 夏季配种对母猪的受孕率和产仔数影响比较大; 秋季配种后的母猪, 对仔猪的育成率影响比较大; 而冬季配种对于大约克母猪和仔猪来说, 影响相对较小。故大约克母猪的适宜配种期在冬季。

关键词: 大约克; 母猪; 季节; 繁殖性能

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0001-03

原产于英国的大约克猪是当今世界的主要瘦肉型猪品种, 是培育二元母猪的主要母本和父本。其具有生长速度快、饲养报酬高、适应性及抗病力强等特性, 目前在我国饲养广泛。我国气候复杂多样, 地区、季节温差明显, 季节温度的变化直接影响着大约克猪的繁殖性能, 特别是我国南方地区的高温季节对大约克母猪繁殖性能的影响十分明显。为摸索不同季节配种对大约克母猪繁殖性能的影响, 以及为科学制定提高母猪繁殖性能措施提供依据, 我们对杭州市某猪场近三年的大约克母猪繁殖记录进行了一次调查统计, 结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料来源

选取杭州市某猪场2009年3月1日至2012年2月28日三年间的大约克母猪繁殖记录, 剔除数据不全的个体, 最终选取了1 532头大约克母猪断奶后第一次配种的繁殖记录。

1.2 分析方法

按春夏秋冬四个季节分组分析。春季: 每年3月1日~5月31日; 夏季: 每年6月1日~8月31日; 秋季: 每年9月1日~11月30日; 冬季: 每年12月1日~翌年2月28日。

1.3 分析项目

返情率、配种分娩率、产仔数、产活仔数、出生重、断奶头数、育成率等。

2 结果分析与讨论

2.1 对受孕的影响

从表1来看, 平均气温在28℃的夏季返情率

最高, 为27.95%, 分别比春、秋、冬高出了7.5、2.89和9.64个百分点; 夏季配种分娩率则为70.81%, 分别比春、秋、冬降低了8.24、3.46和10.61个百分点。

表1 不同季节配种对受孕的影响

季节	平均气温(℃)	首配头次 ¹⁾	返情头数	返情率(%)	分娩胎数	配种分娩率(%)
春(3~5月)	16.33	401	82	20.45	317	79.05
夏(6~8月)	28	322	90	27.95	228	70.81
秋(9~11月)	19.26	443	111	25.06	329	74.27
冬(12~2月)	5.72	366	67	18.31	298	81.42

1): 首配头次指母猪断奶后第一次配种个体, 不包括返情后配种个体。

环境温度的变化直接影响着母猪的繁殖性能。高温会引起母猪体温升高, 形成炎热的子宫环境, 不利于受精卵的发育和附植, 从而造成配种后的母猪无法受孕, 出现再次发情现象^[1]。此外公猪适宜饲养温度为18~24℃, 睾丸温度只有低于公猪体内正常温度才能产生正常精子。当环境温度高于26℃时, 会导致公猪精液品质的降低, 从而使种公猪的生产性能受到影响。从表1来看, 温度最高的夏季, 发情母猪配种后返情率最高, 故其配种分娩率最低; 秋季的平均温度虽在19.26℃, 与春季温度相近, 但从杭州气象局统计数据得知, 秋季9月份的平均温度在25.27℃, 故秋季的配种返情率也高达25.06%; 而春季和冬季相对较低, 分别为

20.45%和18.31%,与夏季和秋季相差明显。郝贵增等^[2]报道,当气温高于26℃时,受胎率会有所下降,但下降比例不大;当气温高于30℃时,受胎率下降明显;而气温高于36℃时,其受孕率极低。

2.2 对母猪产仔的影响

从表2母猪产仔情况来看,冬季配种的母猪胎均产活仔数最高,达9.85头;夏季配种的母猪胎均产活仔最低,为8.23头,分别比春、秋、冬少了0.18头、0.38头和1.62头。国内外学者都曾指出,高温季节会降低公猪的性欲和精液质量,直接后果是公猪精液中死精数量增多,从而使受胎率降低,影响到窝产仔数。此外,在高温季节受孕的母猪,由于妊娠生理和酷暑的双重负担而消耗体力,导致胚胎生长发育受影响,往往会多发死胎。研究表明^[3],在热应激环境下,胚胎早期损失

大幅度增加,存活胚胎数每窝减少2.5枚以上,存活率比在非高温季节降低20多个百分点,明确指出热应激可降低猪早期胚胎存活率。本次调查结果也表明,夏季配种母猪的胎均产活仔数要低于其他季节,与其结论一致。

仔猪的出生重和怀孕母猪的采食量以及营养水平有很大关系,特别怀孕后期胎儿的生长发育速度会迅速增大,这时母猪的营养与能量水平如果跟不上,分娩出来的仔猪个体往往就会偏小。然而在实际生产中,高温常常影响着母猪的食欲,使母猪采食量下降,造成胎儿发育不良,出生重偏小。本次调查结果也表明,怀孕后期正值高温夏季的春季配种母猪,其仔猪出生重最小,而怀孕期处于温度相对较低的秋季配种母猪,其仔猪出生重表现最好,头均出生重为1.33 kg。

表2 不同季节配种对母猪产仔的影响

配种期 季节	平均温度(℃)	产仔期		分娩胎数	总产仔数	产活仔数	胎均产活仔	头均出生重 (kg)	产活仔率 (%)
		日期	平均温度(℃)						
春(3~5月)	16.33	6.23~9.22	27.99	317	3078	2665	8.41	1.12	86.58
夏(6~8月)	28	9.23~12.23	13.19	228	2089	1877	8.23	1.22	89.85
秋(9~11月)	19.26	12.24~3.24	6.74	329	3002	2833	8.61	1.33	94.37
冬(12~2月)	5.72	3.25~6.22	21.12	298	3023	2935	9.85	1.28	97.09

2.3 对断奶育成率的影响

从表3看,胎均断奶头数冬季配种母猪最高8.68头;其次是春季配种母猪7.74头;夏季配种和秋季配种的母猪相对较低,分别是7.17头和7.26头。育成率则春季配种母猪最高92.47%;次之是冬季配种母猪88.11%和夏季配种母猪87.11%,秋季配种母猪最低84.29%。

母猪怕热,仔猪怕冷,高温对母猪的影响普遍会受到生产管理者的重视,然而寒冷对仔猪的影

响,我们也不能忽视。初生仔猪由于大脑皮层发育不健全,体温调节机能差,同时初生仔猪皮下脂肪很薄,被毛稀少,造血功能不全,提供热能的体脂和糖元储藏量少,因而抵抗寒冷的能力差,因此仔猪对温度的要求较高^[4,5]。国内学者普遍认为哺乳仔猪对冷应激敏感,在低温(10℃以下)环境下,仔猪成活率明显下降。而在一定范围内高温对幼龄仔猪无不良影响^[4]。陈赞谋等^[5]研究表明气温与哺乳仔猪的成活率呈正相关。本次调查数据分析结果也再次

表3 不同季节配种对断奶仔猪的影响

配种期 季节	平均温度(℃)	产仔期		产仔窝数	产活仔数	断奶头数 ¹⁾	胎均断奶头数	育成率 (%)
		日期	平均温度(℃)					
春(3~5月)	16.33	6.23~9.22	27.99	317	2665	2454	7.74	92.47
夏(6~8月)	28	9.23~12.23	13.19	228	1877	1635	7.17	87.11
秋(9~11月)	19.26	12.24~3.24	6.74	329	2833	2388	7.26	84.29
冬(12~2月)	5.72	3.25~6.22	21.12	298	2935	2586	8.68	88.11

1): 采用28日龄断奶。

佐证了这一点,仔猪的断奶育成率随着季节温度的上升而提高。

3 小结

3.1 夏季高温将直接影响着大约克母猪的配种受孕率和产仔数,故采用季节性产仔的规模化猪场,母猪的配种不宜集中在夏季进行。

3.2 秋季配种的母猪,产仔期集中在寒冷的冬季,虽然低温对大约克母猪影响没有高温季节明显,但低温对仔猪会造成不小的影响。

3.3 冬季配种对于母猪和仔猪来说,影响相对较小,故采用季节性产仔的配种期最适宜在冬季。

3.4 高温对大约克母猪的影响和低温对仔猪的影响是十分明显的,故在生产管理上要重点做好夏季

的防暑降温工作和冬季的保暖工作,以减少大约克母猪胚胎的早期死亡,提高仔猪的出生重和断奶育成率。

参考文献:

- [1] 潘新尤,徐杰.气温对母猪受胎率的影响[J].养猪,2012(2):37-38.
- [2] 郝贵增,靳玉芬,张福良,等.热应激对母猪繁殖性能的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2002(8):34.
- [3] 赵永庆,崔天英,翁经强.杜洛克猪育种研究进展[M].中原农民出版社,2003:291-295.
- [4] 张双玲,陶志平,陈洪林.环境温度对版纳小耳猪种母猪繁殖性能的影响[J].养殖技术顾问,2011(2):190-191.
- [5] 陈赞谋,黄冰.气候因子对母猪繁殖性能的影响[J].家畜生态,2002,23(2):7-10.

农业部:严打生鲜乳中违法违规添加各类物质

据农业部网站消息,农业部近日印发《2013年农产品质量安全专项整治方案》,组织开展6个专项整治行动,强化执法监管,严查大案要案,严厉打击非法添加和违规使用禁限用农兽药行为,努力确保不发生重大农产品质量安全事件。

一是农药及农药使用专项整治行动。以甲胺磷等禁用高毒农药和克百威、氧乐果、水胺硫磷、氟虫腈等限用农药为监管重点,以大中城市蔬菜生产基地和全国蔬菜、水果、茶叶优势区重点县为重点区域,严厉打击农药生产经营单位非法添加未经登记有效成分的行为、农产品生产单位违规使用未经登记农药的行为。

二是“瘦肉精”专项整治行动。以生猪、肉牛、肉羊为重点产品,以生猪调出大县、肉牛和肉羊养殖优势县为重点区域,严厉打击饲料中添加“瘦肉精”、养殖过程中饲喂“瘦肉精”、收购贩运及待宰前使用沙丁胺醇、向养殖户销售的兽药中添加“瘦肉精”等违法行为。

三是生鲜乳违禁物质专项整治行动。以奶牛主产省区、奶牛养殖大县和奶牛养殖重点区为重点区域,严厉打击生鲜乳收购站和运输车无证经营、生鲜乳中违法违规添加各类物质、私自倒卖和非法收购不合格生鲜乳的违法行为。

四是兽用抗菌药专项整治行动。以兽药批发市场、集散地为重点区域,严厉打击套用或伪造文号等非法生产销售兽药的行为,违规添加抗菌药、禁用兽药或人用药品等擅自改变组方的行为,超剂量超范围用药、违规使用原料药、不执行休药期的行为。

五是水产品禁用药物和有毒有害物质专项整治行动。以鳊鱼、鲢鳙类、乌鳢为重点,严厉打击违法使用硝基呋喃类代谢物、孔雀石绿等禁用药物和有毒有害物质的行为。

六是农资打假专项治理行动。以种子种苗、农药、肥料、兽药、饲料和饲料添加剂、水产苗种、农机具等为重点产品,以农资批发市场、专业市场、集散地、运销大户和乡村流动商贩为重点区域,严厉打击制售假劣农资的违法行为。

农业部要求各地农业部门,一是强化责任落实,制定工作方案,确保工作落实。二是狠抓隐患排查,开展拉网式检查,对发现的问题隐患,要及时预警,主动设防。三是严查大案要案,采取挂牌督办、集中办案、联合查案等形式,查办一批大案要案,端掉一批黑窝点,严惩一批违法犯罪分子,公布一批典型案例。四是加强协调配合,建立案件会商、抽检结果共享、信息通报交流等制度,强化产地、销地衔接配合,形成执法合力。五是健全长效机制,不断探索行之有效的监管措施,进一步完善农产品质量安全监管制度机制。(来源:中国农业新闻网)

影响猪常温精液品质的因素分析

李凤霞¹, 刘建营^{2,3}

(1. 广东省养猪行业协会, 广东 广州 510500; 2. 广东省畜牧技术推广总站, 广东 广州 510500; 3. 农业部种猪质量监督检验测试中心, 广东 广州 510520)

摘要: 本文从原精液品质、稀释液特性、保存温度等几个方面阐述了影响猪常温精液保存效果的主要影响因素, 探讨了猪常温精液保存中易出现的问题, 并提出了建议和解决方法。

关键词: 猪; 常温精液; 效果; 分析

中图分类号: S814.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0004-02

猪人工授精技术在品种改良、降低成本、猪群净化、减少引种风险等方面发挥了重要作用。随着猪人工授精技术在集约化、规模化、现代化猪场的迅速推广和应用, 猪常温精液质量已经引起畜牧主管部门、科研机构和广大养殖者的广泛重视。国家在2009年5月1日颁布实施了《GB23238-2009猪常温精液》国家标准, 并委托部分质检机构对承担国家猪良种补贴的供精站(点)的猪常温精液品质进行监督检验。影响猪常温精液品质的因素主要有原精液品质、稀释液特性、保存温度等几个因素, 本文结合国内外最新研究进展对这几个因素进行逐一分析和论述, 希望能对畜牧业生产有所帮助。

1 原精液品质

影响公猪原精液品质的因素主要有遗传、年龄、饲养管理、环境、健康状况以及采精频率、采精技术等。

1.1 遗传

遗传因素是决定公猪繁殖力的主要因素^[1], 对原精液品质具有决定性作用。不同品种猪其体型大小、睾丸大小、射精量、射出精子数、精子畸形率等都不尽相同, 换言之, 不同品种的猪遗传特性不同, 所以, 原精液品质也不尽相同。因此, 为获得品质好的原精液, 应该根据实际需要, 选择雄性特征明显, 生殖器官发育良好、性欲旺盛、体格健康的种公猪。

1.2 年龄

公猪原精液量和精子密度从性成熟到壮年逐年增加, 随后会不断下降^[2]。所以, 为获得最佳原

精液品质, 应该选择2~3岁公猪, 一般不超过4岁。对特别优秀的种公猪可适当延长使用年限。

1.3 饲养管理

要提高种公猪使用效率和精液品质, 就要加强种公猪饲养管理。饲养方面: 由于种公猪精液中大部分物质是蛋白质, 所以要给公猪提供氨基酸平衡的饲料, 还要特别重视维生素A、D、E和B族维生素、微量元素^[3]等的补充; 此外还要根据种公猪膘情, 控制饲喂量, 在采精集中期, 每天补充一些动物性饲料, 如鸡蛋、鱼粉等。管理方面: 加强种公猪的运动; 实行单栏饲养; 适时调教青年种公猪; 及时免疫和驱虫。

1.4 环境

种公猪对高温比较敏感。高温环境下, 种公猪精神沉郁, 性欲降低, 采食量明显减少, 从而造成采精量减少, 精子活力降低, 精子密度下降^[4], 精子畸形率升高等不利因素, 继而影响种公猪的繁殖性能。针对这些情况, 在我国, 尤其是南方地区, 要采取降温措施, 如喷雾、加装风扇、水帘降温等, 条件允许的猪场可以建立全封闭式空调猪栏。

1.5 健康状况

疾病对种公猪精液品质影响很大。睾丸炎、附睾炎、附性腺炎等生殖系统疾病可以造成死精、少精和无精或使精液中出现血液、絮状物等杂质; 布鲁氏菌、乙型脑炎病毒、衣原体等病原体可以导致公猪繁殖能力降低, 继而影响精液品质。因此, 要及时进行疫苗接种, 对已经出现症状的病猪要采取药物治疗, 如果发生布鲁氏菌病, 一般直接淘汰

病猪,以彻底消灭传染源。此外,要建立运动场地,让公猪适当运动,以提高繁殖机能^[5]。

2 稀释液特性

原精液采集出来后,为了保持其受精能力,须将其在一定温度下保存在特定的环境中,这就需要稀释液。早期猪人工受精使用稀释液的目的很简单,增加精液的容量,配更多的母猪。然而随着猪人工受精技术的发展,现在使用稀释液的目的主要是增加常温精液的保存时间。

目前畜牧生产上使用的稀释液按照来源分为进口、国产和自配稀释液3种;按照保存时间分为短效稀释液(1~3天)、中效稀释液(3~5天)和长效稀释液(5天以上)。

稀释液的配方一般要满足以下几点要求:(1)对精子无损害作用;(2)能供给精子能量;(3)酸碱环境适合精子生存;(4)渗透压适当;(5)原料价格合适、配制简便^[6]。

稀释液的配方成分一般为葡萄糖、EDTA、卵黄、抗生素、碳酸氢钠或者柠檬酸钠和某些添加剂。

稀释液的特性主要通过以下几个因素来体现,这些因素继而影响常温精液的品质。

2.1 pH值

猪原精液pH值为7.2~7.5,猪常温精液保存就是利用稀释液的弱酸性环境,降低精子的代谢和运动能力,从而延长精子的存活时间。林峰^[7]等研究发现,稀释液pH值在6.5~6.9时精子存活时间最长,这与郭洪杞^[8]等的研究结果基本一致。为了防止精液pH值发生变化,一般使用柠檬酸钠和磷酸盐缓冲液,此外,畜牧生产上使用较多也还有Tris缓冲液、HEPES和MOPS等缓冲剂。

2.2 渗透压

稀释液的渗透压主要由非离子物质(如葡萄糖等)维持^[9]。猪精液可以耐受的渗透压范围是240~380 mosM^[10]。在这个范围内的渗透压对精子质量影响不大,但大多数人认为等渗和稍高渗环境有利于猪精液的保存。所以,在配置稀释液时要注意溶液的渗透压,以减少对精液的影响。

2.3 抗生素

猪精液在采集和分装过程中会受到细菌等微生物的污染。由于猪精液中含有多种营养物质,有利于细菌等微生物的生长繁殖,所以在常温精液中要加入抗生素抑制或杀死微生物,延长精液保

存时间,提高受精能力。猪精液中最常用的抗生素是青霉素和链霉素。但也有报道认为恩诺沙星^[11]和安苯磺胺^[12]药物的抗菌效果更好。

2.4 营养物质

猪精子运动需要能量,所以在稀释液中要加入能量物质。最常用的是加入葡萄糖,不仅能为精子提供能量,还能维持稀释液的渗透压。

2.5 其他添加物质

有些稀释液中还添加BSA(牛血清白蛋白)和EDTA(乙二胺四乙酸),这两种物质能稳定精子结构,中和精子有毒代谢产物,延长精子保存时间。邱冬生^[13]研究报道,在精液稀释液中加入维生素C和氯丙嗪,可以抑制或降低精子的运动,降低精子细胞膜的脆性和通透性,延长精液保存时间;有试验证明在稀释液中添加适量的维生素E可以减缓精子顶体畸形率的发生,增加顶体完整率,有效减缓外界对精子的伤害作用,改善精液品质。

3 保存温度

在所有影响精子存活的外界环境中,保存温度是最重要的因素之一^[14]。较低温度能够减缓精子运动,降低精子能耗和有毒有害物质的生成,抑制精液中细菌等微生物的生长,继而延长精液保存时间。陈大芳,鲜红等^[15,16]分别通过不同的试验发现:14~18℃条件下保存的猪常温精液效果最好。目前,畜牧生产上一般认为16~18℃是猪常温精液最佳的保存温度,这一温度也被国标《GB23238-2009猪常温精液》采纳。

4 其他因素

4.1 存放或运输中的猪常温精液每天要摇动2~4次,摇动时动作要轻柔,避免剧烈摇动。

4.2 采用泡沫箱加冰运输时,冰不能直接和输精瓶接触,可用报纸、塑料袋等包裹输精瓶,条件允许情况下可以采用车载冰箱运输。

4.3 尽量减少常温精液保存箱门的开关次数,防止频繁温度变化对精子造成不良刺激。

5 小结

如何提高种公猪常温精液品质是近些年畜牧工作者研究的重点课题之一。在理论研究的基础上,畜牧工作者通过改良种公猪遗传性能、改善种公猪饲养环境以及加强种公猪保健等措施从根本上提高原精液品质;此外,还通过不断调整稀释液

(下转第8页)

壳聚糖对獭兔生产性能的影响研究

张亚平

(河北省任丘市动物卫生监督所, 河北 任丘 062550)

摘要: 选用 240 只 45 日龄的獭兔, 随机分成 4 个处理组, 每个处理 6 个重复, 每个重复 10 只獭兔, 饲料中壳聚糖为分别添加 0、0.01%、0.05% 和 0.10%。结果表明: 添加 0.05% 壳聚糖可以显著降低料重比 ($P < 0.05$); 有效预防獭兔腹泻的发生, 对消化率及被毛密度无显著影响

关键词: 壳聚糖; 獭兔; 生产性能; 消化率

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0006-03

Effects of Chitosan on the production performance of Rex Rabbit

Zhang Yaping

(Renqiu Animal Health Supervision Institute of Hebei, Renqiu 062550, China)

Abstract: 240 rex rabbits of 45-day-old were randomly divided into I (control group), II, III, IV groups, each group had 6 replicates, and each replicate had 10 rex rabbits. Chitosan was respectively added into the feedstuff for 1 to 4 group by the amount of 0, 0.01%, 0.05%, and 0.10%. The test period was 50 days. The results showed that the third group effectively reduced the ratio of feed to gain ($P < 0.05$) compared to control group; feedstuff added chitosan had the effect of prevention of diarrhea in rabbits; chitosan had no significant effect on nutrient digestibility and hair density.

Key words: chitosan; rex rabbit; production performance; digestibility

壳聚糖是一种生物大分子, 具有资源丰富、价格便宜、安全无毒、多功能反应性、可再生性及生物相容性等优点, 目前已广泛应用于食品、医药、纺织、环境等领域。在畜牧生产中, 近年来壳聚糖也被认为是优良的抗菌剂、免疫增强剂、促生长剂及饲料黏合剂等^[1]。目前研究发现饲料中适量添加壳聚糖对肉牛、肉鸡、育肥羊、育肥猪的生产性能产生显著影响^[2-5]。河北是獭兔养殖大省, 年存栏 750 万只左右, 但是壳聚糖在獭兔生产中的应用研究较少, 本文旨在研究壳聚糖对獭兔生产性能的影响, 为壳聚糖在獭兔生产中应用提供试验依据。

1 试验材料与试验动物

试验日期, 2012 年 3 月 12 日至 5 月 7 日; 试验地点, 河北省任丘市阳光种兔场, 能繁母兔 350 只, 年出栏 10 000 只; 试验动物, 选择体重相近、健康的 45 日龄獭兔; 壳聚糖为 (纯度 95% 以上, 脱乙

酰度 90% 以上) 浙江澳兴生物科技有限公司生产。

2 试验设计和日粮组成

2.1 试验设计

单因子完全随机区组设计, 选择生产性能、体质基本一致的獭兔 240 只, 随机分为 4 组, 每组 60 只, 每组 6 个重复, 每个重复 10 只。试验设计方案见表 1。

表 1 试验分组

组别	处理
I	基础日粮
II	基础日粮 +0.01% 壳聚糖
III	基础日粮 +0.05% 壳聚糖
IV	基础日粮 +0.10% 壳聚糖

2.2 日粮组成

基础日粮为玉米 - 豆粕型, 日粮组成及成份见表 2。

表2 日粮组成及成分

原料	含量%	营养水平	含量
花生皮	10.00	消化能(MJ/kg)	10.44
玉米	30.00	粗蛋白(%)	18.03
大豆粕	13.10	粗纤维(%)	12.05
小麦麸	19.60	钙(%)	0.80
芝麻饼	6.00	食盐(%)	0.50
菊花粉	13.50	赖氨酸(%)	0.95
玉米蛋白粉	2.00	总磷(%)	0.64
磷酸氢钙	0.50	蛋氨酸+胱氨酸(%)	0.57
食盐	1.20		
蛋氨酸	0.15		
赖氨酸	0.20		
添加剂	0.50		
球净 ¹⁾	0.25		
酵母	3.00		
合计	100.00		

1):球净为河北农业大学山区研究所研制。

2.3 饲养管理

单笼饲养,自由饮水,通风良好。每日6:00、18:00喂料。本试验预饲7 d,2012年3月12日至3月18日;正式试验为期50 d,2012年3月19日至2012年5月7日。

2.4 检测指标

生产性能指标的测定。记录腹泻及死亡情况、投料量、剩余料量、初始体重、结束体重、毛密度(五点法)。

消化试验在饲养试验末期进行,预试5 d(2012年4月26日至4月30日),正式试验7 d(2012年5月1日至5月7日),采用全收粪法计算营养物质的利用率。

2.5 数据分析与处理

所得数据采用SPSS 12.0软件的one-way-anova进行方差分析,Duncan氏多重比较,以 $P < 0.01$ (差异极显著), $P < 0.05$ (差异显著)作为差异显著性判断标准,结果用平均值±标准误差表示。

3 结果与分析

3.1 壳聚糖对獭兔生产性能的影响

从表3可看出,壳聚糖对獭兔的平均日增重有不同程度的改善,以第III组29.61 g/d日增重最高,第II、III、IV组的日增重分别为28.79 g/d,29.61 g/d,29.28 g/d,试验组分别较对照组高出2.52%、5.45%和4.27%,但差异均不显著($P > 0.05$);平均日采食量试验组与对照组差异不显著($P > 0.05$);料肉比试验组III与对照组差异显著($P < 0.05$),试验组II、IV与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

3.2 壳聚糖对营养物质消化率的影响

分析表4可知,在本试验条件下,饲料中添加不同比例的壳聚糖对营养物质的消化利用率有一定的影响。第II、III、IV组粗蛋白、粗脂肪、粗纤维、磷的消化率均略高于对照组,但各组之间差异不显著($P > 0.05$),其中均以添加0.05%第III组消化率最高;钙的消化率,试验组也是略高于对照组,没有达到明显差异($P > 0.05$)水平,其中添加0.01%的II组消化率最高。

3.3 壳聚糖对腹泻率、死亡率及毛密度的影响

从表5可看出,添加壳聚糖的试验组未发生腹泻,说明壳聚糖对预防或者抑制獭兔腹泻有一定的影响,这与李国彦等^[2]在仔猪上的研究结果相近;整个试验期无獭兔死亡;平均被毛密度试验组与基础日粮组差异不显著($P > 0.05$),当日粮添加0.05%壳聚糖时,獭兔被毛密度最高。

4 讨论与分析

目前国内关于壳聚糖对獭兔生产性能影响的研究为空白。在肉鸡、肉牛、鲫鱼、育肥羊、育肥猪方面的研究表明,适量添加壳聚糖可以显著提高肉仔鸡的平均日增重并且降低料肉比^[3];日粮中添加壳聚糖对仔猪生产性能无显著影响,但可降低猪皮下脂肪及体脂沉积,提高瘦肉率^[4];饲料中

表3 壳聚糖对獭兔生产性能的影响

组别	初始体重(g)	结束体重(g)	平均日增重(g/d)	平均日采食量(g/d)	料重比
I	1106.10±31.22	2510.20±55.62 ^{a1)}	28.08±1.77 ^a	147.04±0.83 ^a	5.23±0.08 ^a
II	1095.00±39.72	2534.50±62.85 ^a	28.79±1.31 ^a	149.11±5.98 ^a	5.17±0.09 ^a
III	1110.00±43.55	2590.40±35.45 ^a	29.61±2.25 ^a	135.49±6.72 ^a	4.57±0.15 ^b
IV	1101.20±29.85	2565.00±65.35 ^a	29.28±2.75 ^a	158.54±3.15 ^a	5.41±0.10 ^a

1):同列肩标相同小写字母者表示差异不显著($P > 0.05$),肩标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

表 4 壳聚糖对营养物质表观消化率的影响

组别	粗蛋白(%)	粗脂肪(%)	粗纤维(%)	磷(%)	钙(%)
I	74.21±1.67 ^a	76.25±0.65 ^a	24.03±1.77 ^a	47.04±0.83 ^a	49.77±0.08 ^a
II	75.25±1.29 ^a	77.71±1.99 ^a	25.55±1.31 ^a	48.11±5.98 ^a	51.71±0.09 ^a
III	75.97±1.05 ^a	78.52±1.04 ^a	25.81±0.82 ^a	50.49±6.72 ^a	51.62±0.15 ^a
IV	74.52±1.81 ^a	76.73±2.15 ^a	24.23±1.65 ^a	49.54±3.15 ^a	50.66±0.10 ^a

表 5 壳聚糖对腹泻率、死亡率及毛密度的影响

组别	腹泻率(%)	死亡率(%)	平均每被毛密度(根/cm ²)
I	2.71	0	141511±160 ^a
II	0	0	139256±234 ^a
III	0	0	142018±466 ^a
IV	0	0	139867±369 ^a

添加壳聚糖可以促进肉牛生长,提高营养物质消化率^[5]。由此可见,壳聚糖在畜牧生产中的效果不一,除了畜种差别外,造成这种结果也可能与壳聚糖的添加比例有关。结合本文研究,饲料中添加0.05%的壳聚糖可以降低料肉比,提高獭兔对饲料

的利用率,这可能与壳聚糖本身的生物活性有一定关系,其分子机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘国花,张文举,谢正军.壳聚糖的生物学功能及其在畜牧生产中的应用[J].中国饲料,2010(23):27-29.
- [2] 李国彦,于维军.壳聚糖对仔猪腹泻率的影响[J].现代畜牧兽医,2010(7):51-53.
- [3] 刘梅,史挺.壳聚糖对肉仔鸡生长性能及血清生化指标的影响[J].粮食与饲料工业,2009(10):41-43.
- [4] 周晓容,杨飞云,姚焰础,等.壳聚糖对肥育猪生产性能、体脂沉积及血脂的影响[J].中国饲料,2007(14):21-24.
- [5] 于萍,赵育国,史彬林,等.壳聚糖对肉牛生长性能及营养物质消化率的影响[J].饲料工业,2012(13):44-48.
- [6] 覃灿,封桂甲.一种简单实用的猪精液常温保存稀释液在容县的推广应用[J].广西畜牧兽医,1994(2):28-29.
- [7] 林峰,杨婷,陈玉霞,等.温度与稀释液pH值对猪精液常温保存效果的影响[J].家畜生态学报,2012,33(4):68.
- [8] 郭洪杞,罗杰,王文强,等.猪精液稀释液常温保存研究[J].安徽农业科学,2005,33(12):69.
- [9] 高飞,岳奎忠,杨增明.猪精液液态保存的研究进展[J].中国畜牧杂志,2004,40(6):46-49.
- [10] 张宝珣,戈新,王建华,等.猪常温精液保存的研究进展[J].猪业科学,2009(8):69.
- [11] 茆达干,杨利国,王元兴.不同稀释液对猪精液常温保存效果的研究[J].畜牧兽医杂志,2002,21(1):3-7.
- [12] 程文聪,刘春华.猪精液常温保存稀释液的筛选试验[J].养殖与饲料,2006(8):8-11.
- [13] 邱冬生.延长常温保存生精液有效期的研究[J].江西畜牧兽医杂志,2003(4):9.
- [14] 潘红梅,蔡元,王涛,等.两种抗菌药对猪精液常温保存效果的影响[J].甘肃畜牧兽医,2007,37(2):7-9.
- [15] 陈大芳,王艳,钟孟准.猪精液常温保存稀释液配方比较试验[J].贵州畜牧兽医,1998,22(4):8-9.
- [16] 鲜红,郑宏培.猪精液常温保存稀释液配方筛选试验[J].国外畜牧学-猪与禽,2004,24(3):4-6.

(上接第5页)

配方,如pH值、渗透压、抗生素种类和浓度、营养物质以及添加对精子具有特殊保护的物质等,期望努力营造精子在体外的最佳生存环境。希望通过这些措施,能不断提高常温精液的保存时间和生产应用效果,同时增加遗传物质的交流和使用范围,进一步推动人工受精技术的发展,为我国生猪遗传改良计划的快速稳步实施提供技术保障。

参考文献:

- [1] Rothschild M F. Genetics and reproduction in the pig [J]. Anima Reproduction Science (Netherlands), 1996 (1):143-151.
- [2] 王玉良.种公猪年龄与精液品质的关系[J].上海畜牧兽医通讯,2001(6):27.
- [3] 穆勇攀,李慷,李新民.乳酸型复合酸化剂饲喂效果试验[J].畜牧兽医杂志,2011(6):7-8.
- [4] 张伟,易康乐.影响种公猪精液品质主要因素的研究[J].国外畜牧学-猪与禽,2011,60:83.
- [5] 梁巍.充分发挥种公猪性能的饲养管理[J].黑龙江动物繁殖,2007(2):38.

一株新城疫病毒广东分离株的遗传关系分析

贾伟新, 谢淑敏

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据新城疫病毒已报道的基因序列设计了一对引物, 扩增F基因3'端374 bp片段, 包括F基因信号肽序列和裂解位点。经过RT-PCR、PCR产物测序和序列分析, 表明该毒株为基因VII型强毒株, 和中国动物卫生与流行病学中心2009年分离到的毒株NDV09-038相似性最高, 可达98%。基因进化树分析表明该毒株与常用疫苗株亲缘关系较远, 与I系疫苗株Mukteswar相似性为81.4%, 与Herts'33的相似性为84.5%。氨基酸序列分析表明该毒株为典型的强毒株。

关键词: 新城疫病毒; F基因; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0009-03

Phylogenetic analysis of a Newcastle disease virus strain isolated from Guangdong

Jia Weixin, Xie Shumin

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A pair of primers was designed based on Newcastle disease virus gene sequences reported, and used to amplified a 374bp fragment located at the 3' end of F gene including the signal peptide sequence and cleavage site of F gene. After RT-PCR, sequencing and sequence analysis, the results showed that the NDV strain belonged to genotype VII. The highest homology was 98% between FS/11-8 and NDV09-038 strains isolated by the China Animal Health and Epidemiology Center. The phylogenetic analysis showed that the strain had the far genetic relationship with the Mukteswar and Herts'33 vaccine strains. The amino acid sequence analysis indicated that the strain was a typical virulent strain.

Key words: Newcastle disease virus; F gene; sequence analysis

新城疫(Newcastle Disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle Disease virus, NDV)引起禽的一种急性、高度传染性疾病, 主要侵害鸡、火鸡, 也可感染其他禽类、鸟类及人, 是危害养禽业的重要传染病^[1]。目前, 由于人们对新城疫有了较为深刻的认识和研究, 新城疫的防治有很大程度的提高, 但是, 由于受毒株的变异和其它一些环境因素的影响, 非典型新城疫和小范围内的急性爆发仍然困扰着我国的养禽业。

新城疫广东分离株FS/11-8是2011年12月在广东某种鸡场分离到的毒株。该鸡场先是3-4周龄的鸡出现神经症状, 死亡率增加, 月死亡淘汰率可达8%~10%, 此后其他鸡群陆续出现有神经

症状的病鸡, 但消化道、呼吸道无明显出血病变。该毒株经过实验室分离、毒力指标测定和人工发病实验, 证明为强毒株; 经鸡胚盲传三代后, HA滴度达到 $10\log_2$ 。该毒株具有毒力强、HA滴度高等特点, 感染鸡临床症状典型, 具有较好的研究价值。为了研究该毒株的分子流行病学特征, 分析它和其它代表毒株的衍化关系, 我们进行了该毒株的F基因3'端374 bp片段的克隆测序, 该区包括F基因信号肽序列和裂解位点^[2]。分析了它的分类地位、毒力特征等, 为广东地区新城疫的防治提供了非常有益的参考。

1 材料和方法

1.1 毒株

FS/11-8 毒株由本实验室 2011 年 12 月在广东某种鸡场分离, 并繁殖保存。

1.2 引物

参考 Genbank 公开序列自行设计一对引物, 预期扩增片段长度为 374 bp, 扩增片段包括 F 基因信号肽序列和裂解位点区。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列如下:

上游: 5'-ATGGGCTTCAAACCTTCTAC-3'

下游: 5'-ACACTGCCAATAACAGCACC-3'

1.3 RNA 提取及反转录

参照 Invitrogen 公司 Trizol LS Reagent Total RNA 提取试剂说明书进行。

1.4 反转录产物 PCR

采用 25 μ L PCR 反应体系: 0.5 μ L 上游引物 (25 pmol), 0.5 μ L 下游引物 (25 pmol), 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 2 μ L 2.5mM dNTP, 1 μ L 反转录产物, 0.5 μ L EX Taq 酶, 最后加灭菌三蒸水补至 25 μ L。混匀后进行 PCR 反应。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 3min 后, 94 $^{\circ}$ C 1min, 53 $^{\circ}$ C 30S, 72 $^{\circ}$ C 45S, 进行 30 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 RT-PCR 产物检测

取 PCR 产物 5 μ L 在 1% 琼脂糖凝胶 (EB 浓度为 0.5 μ g/mL) 检测结果。

将阳性 PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

将得到的序列与 Genbank 公开序列进行多序列比较, 并选取国内外多株疫苗毒株采用 DNAs-tar 序列分析软件分析。

2 结果

2.1 RT-PCR

将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 可见阳性条带, 大小与设计相符 (图 1)。

2.2 FS/11-8 株与代表毒株基因序列比较

将所获得的基因的序列与各基因型的代表株 (Que/66、BI/47、Australia-Victoria、HER/33、NY 70181/70、IT-148/95、MZ-48/95、DE 143/95、TW/95-7、NDV09-038 和 TW/99-157) 和疫苗株 (LaSota、B1、Mukteswar、Queensland V4 和 Herts' 33/H 等) 进行同源性比较, 发现和中国动物卫生与流行病学中心 2009 年分离到的毒株 NDV09-038 相似性

最高, 可达 98%, 该株病毒为基因 VII 型。而和 I 系疫苗株 Mukteswar 的相似性只有 81.4%, 与 Herts' 33 的相似性为 84.5%, 和其它常用疫苗株如 II 系、IV 系和 V4 系的相似性还不到 80%。进化关系见图 2。

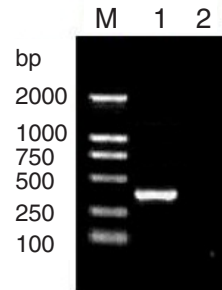


图 1 RT-PCR 扩增结果

M: DNA Marker DL2000; 1: FS/11-8 毒株的 RT-PCR 扩增结果; 2: 以 H₂O 为模板的阴性对照

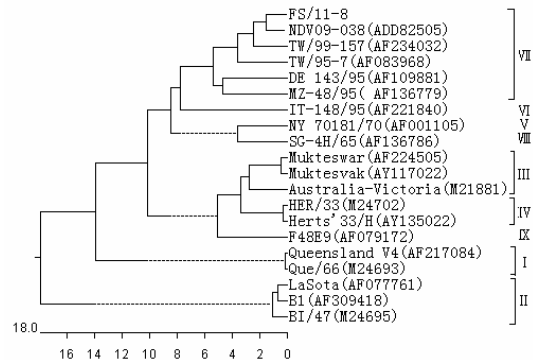


图 2 FS/11-8 株的同源进化树分析

从对 FS/11-8 株基因推导氨基酸序列差异性比较可以看出, 该毒株在 F 蛋白裂解位点的边界标志区第 112-117 个氨基酸残基为 RRQKRF, 为典型的强毒株标志序列。见表 1。

3 讨论

新城疫病毒的毒力由 F、HN 糖蛋白决定。在新城疫病毒感染宿主细胞时, F 蛋白无活性的前体 F₀ 被胞内酶水解, 产生以二硫键相连的 F₁ 和 F₂。F₀ 的裂解是病毒感染所必需的, 它的裂解能力是区分强弱毒的关键。F₀ 蛋白的裂解能力是由 F₁/F₂ 多肽裂解位点的边界标志区的序列所决定的。另外, F 蛋白所介导的细胞融合和新城疫病毒的致病能力呈正相关。因此, 对 F 基因的序列分析可以很好的了解毒株之间的亲源关系和病毒的毒

表 1 FS/11-8 株基因推导氨基酸序列差异性比较

	70
MGFKPSTRIPAPLMLITRIMLILSCIRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNVYTSSQTGSIIVKLLPNMP	FS/11-8
--P-S-NV-----TV-A-A-V-N-----I-----	F48E9 (AF079172)
--SRS---V-----R---S-----G-YI--SI-----	TW/95-7 (AF083968)
--S---SV-----T---C-----I-----	NY 70181/70 (AF001105)
--S---T-V-----S-Y-----I-----	DE 143/95 (AF109881)
--SR--KN--M--TI-VA-V---CPAN-I-----I-----L-	LaSota (AF077761)
--S-----V-----V---CS-G-----I-----	MZ-48/95 (AF136779)
--S-S---T-----T---C-----I-----	SG-4H/65 (AF136786)
--SRS---V---TV-V-A---VCP-A-----I-----I-----	Queensland V4 (AF217084)
--SRS---V-P---I-V-T-----I-----	HER/33 (M24702)
--SR--K---M--TI-VA-V---CPAN-I-----I-----L-	BI/47 (M24695)
--S---GVLP-----SVC-----I-----I-----I-----	IT-148/95 (AF221840)
--PRS---V---TI-T-A-YV-----I-----	Mukteswar (AF224505)
--SRS---E-----H-----S-----	TW/99-157 (AF234032)
--SRS---V---TV-V-A---VCP-A-----I-----I-----	Que/66 (M24693)
--PRS---I---TI-A-A---VH-A-----I-----	Australia-Victoria (M21881)
--SR-F-KN--M--TI-VA-V---CPAN-I---F-----I-----L-	BI (AF309418)
--S-----M-----	NDV09-038 (ADD82505)
--PRS---V---TI-T-A-YV-----E---I-----	Muktesvak (AY117022)
--SRS---V-P---I-V-T-----I-----	Herts' 33/H (AY135022)
124	
RDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLPLGDSIRKIQGSVSMGGRRQKRFIGAVIGS	FS/11-8
K-----A-----R-E-ATT- R ---I---	F48E9 (AF079172)
K-----T- --- ---	TW/95-7 (AF083968)
K-----R-ATT- --- V-I---	NY 70181/70 (AF001105)
K-----TP- --- ---	DE 143/95 (AF109881)
K-----D-----R-E-TT- G-G-L ---I-G	LaSota (AF077761)
K-----R---T-E- --- ---	MZ-48/95 (AF136779)
K-----T-----R---TT- --- I---	SG-4H/65 (AF136786)
K-----R-E-TT- GK-G-L ---I-G	Queensland V4 (AF217084)
K-----RK-E-TT- R ---I---	HER/33 (M24702)
K-----D-----R-E-TT- G-G-L ---I-G	BI/47 (M24695)
-----R---T- R ---I---	IT-148/95 (AF221840)
K-----R-E-TT- R ---I---	Mukteswar (AF224505)
K-----T- --- ---	TW/99-157 (AF234032)
K-----R-E-TT- GK-G-L ---I-G	Que/66 (M24693)
K-----R-E-TT- --- I---	Australia-Victoria (M21881)
K-----D-----R-E-TT- G-G-L ---I-G	BI (AF309418)
----- --- ---	NDV09-038 (ADD82505)
K-----R-E-TT- R ---I---	Muktesvak (AY117022)
K-----R-E-TT- R ---I---	Herts' 33/H (AY135022)

(下转第 29 页)

一起猪附红细胞体病的诊治

阳玉彪

(广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 2012年7月, 南宁市武鸣县某养猪场因外购仔猪引发一起以高热、皮肤出血和可视粘膜苍白为特征的疾病; 发病率为50%, 病死率为4.2%, 死亡率为2.1%。经过临床观察、病理解剖和实验室检查, 诊断为猪附红细胞体病。用咪唑苯脲和盐酸多西环素治疗10天, 除3头危重病猪淘汰外, 其余基本治愈, 治愈率达97%以上。

关键词: 猪附红细胞体病; 诊治

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0012-02

猪附红细胞体病 (*Eperythrozoon suis*, *E. suis*) 是由猪附红细胞体寄生于猪红细胞表面、血浆和骨髓而引起的一种以体温升高、贫血和黄疸为主要特征的猪传染病^[1]。猪附红细胞体病可感染人和多种动物, 其中猪的发病率较高^[2], 但多为隐性感染, 严重者可造成机体免疫力下降, 易继发感染或与其它疾病混合感染。调查显示, 各生长阶段猪的感染率达80%~90%^[3], 给养猪业带来很大的经济损失。

1 发病情况

2012年7月, 南宁市武鸣县某养猪场从外地购入68头仔猪, 与原存栏的218头仔猪一起饲养。外购仔猪首先发病, 随后原存栏猪也陆续发病。病猪体温40~41.5℃, 多处皮肤有出血点, 可视粘膜苍白。采用青霉素、链霉素等常规抗生素治疗无效。有143头发病, 6头死亡; 发病率为50%, 病死率为4.2%, 死亡率为2.1%。

2 临床症状

精神沉郁, 低头耷耳, 卧地不起; 食欲明显减少或不食, 尚饮水; 体温40℃~41.5℃, 呈稽留热; 呼吸急促; 大部分病猪可视粘膜苍白; 耳背及腹部等处皮肤发紫发红, 耳尖、脐部、四肢内侧及腹下皮肤有小出血点(见图1、图2)。

3 病理变化

剖检病死猪发现, 血液稀薄、色泽变淡; 全身性黄染; 胸腔和腹腔积液; 心包积液, 心脏苍白, 心肌松软; 肝脏肿大呈黄棕色(见图3); 脾脏和肾脏均

肿大; 淋巴结肿大, 切面外翻。



图1 耳尖皮肤小出血点



图2 腹下皮肤小出血点



图3 肝脏稍肿大且呈黄棕色

4 实验室检查

4.1 血液压片镜检

采发热期间的病猪静脉血 1 滴于载玻片上,加等量生理盐水混匀,盖上盖玻片,在显微镜下观察。可见红细胞表面附着有球形、椭圆形、豆点状和颗粒状的小虫体,大部分红细胞已变形。

4.2 血液涂片染色镜检

病猪采血,于载玻片上推片,姬姆萨染色,镜检。红细胞呈菜花状、星月状等形态,红细胞表面附着有许多球形、圆形、椭圆形、颗粒状的紫红色小虫体(图 4)。

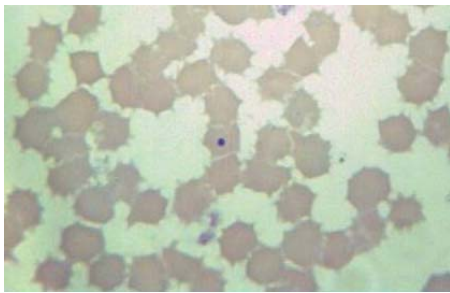


图 4 红细胞边缘不整齐,表面附着小虫体

4.3 组织涂片镜检

取病猪的肝、脾、淋巴结等病料涂片,革兰氏染色,镜检。未发现细菌。

4.4 细菌培养

取病猪的肝、脾、淋巴结等分别接种于普通琼脂、麦康凯琼脂和鲜血琼脂平板,于 37.0 °C 培养 24~48 h,均无细菌生长。

4.5 巢式 PCR 检测

按照郑秀红《猪附红细胞体巢式 PCR 诊断方法的建立及初步应用》^[4]进行巢式 PCR,检测血样中猪附红细胞体的存在情况。结果 1-8 号血样均得到 1 条 395 bp 的特异性条带(见图 5),与预期大小一致;9-10 号血样未出现特异性条带,为阴性。猪附红细胞体感染率为 80%。

5 诊断

根据临床观察、病理解剖和实验室检查,诊断为猪附红细胞体病。

6 治疗

对发病猪采取个体治疗,对假定健康猪采取群体预防。综合防治方案如下:

6.1 隔离病猪。执行严格的卫生和消毒制度,防治疫情扩散。

6.2 全场进行驱蝇灭蚊工作。

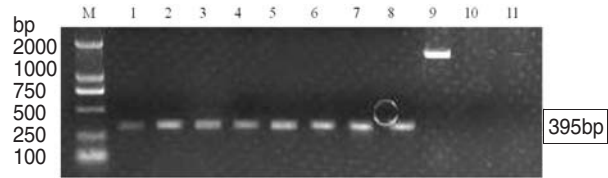


图 5 巢式 PCR 检测结果

M 为 DL2000Marker;1-10 号为 10 份血液样品;11 号为阴性对照

6.3 肌肉注射咪唑苯脲,按 2~5 mg/kg 体重,深部肌肉注射,隔 48 小时注射 1 次,连续 5 次。

6.4 盐酸多西环素按 0.15 mL/kg 体重肌注,间隔 24 小时注射 1 次,连注 3 次。

6.5 用盐酸多西环素复方制剂全群拌料,连续饲喂 10 天。

经上述治疗后,第 3 天病猪体温恢复正常,症状逐渐减轻,病情得到缓解;5 天后,全场病猪明显好转,咳嗽减少、黄疸消退、贫血改善;10 天后,除 3 头危重病猪淘汰外,其余基本治愈,治愈率达 97% 以上,效果良好。

7 小结与讨论

7.1 通过综合检测,诊断该病例为猪附红细胞体病。

7.2 猪附红细胞体病多发于潮湿、高温、吸血昆虫大量孳生的季节。因此,在我国南方,夏季时要对该病引起高度重视。

7.3 本病的发病诱因主要是各种应激因素(如断奶、转栏、突然改变饲料、天气骤变、长途运输等)。因此,最好坚持自繁自养,并在日常饲养管理中尽量减少或避免各种应激。

7.4 本实验应用巢式 PCR 检测猪附红细胞体的感染率为 80%,与调查显示各阶段猪附红细胞体的感染率达 80%~90%^[3]相符。因此,养猪生产实践中要高度重视猪附红细胞体病的预防。

7.5 本病易继发或混合感染其它疾病,在诊断、防治本病时,要注意考虑是否发生混合感染或继发感染,以便采取相应的防治策略。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第 4 版. 北京:中国农业出版社, 2001: 141-143.
- [2] 尚德秋, 李兰玉. 附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 1997, 18(3): 150.
- [3] 程宝艳, 胡晓苗, 余为一. 猪附红细胞体病的研究进展[J]. 中国猪业, 2007, 2(11): 36-38.
- [4] 郑秀红, 邢莹, 贾立军, 等. 猪附红细胞体巢式 PCR 诊断方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 194-197.

猪场病原检验方法的应用分析与建议

朱秀高

(武汉回盛生物科技有限公司, 湖北 武汉 430042)

中图分类号: S854.4*3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0014-03

近年来,随着养猪规模的扩大及国外引种数量的增长,养殖硬件设施条件不断改善,养猪人员的技术水平不断提高,经验也得到不断积累。但还有一些新的疾病持续出现,如高致病性蓝耳病、圆环病毒病;也有一些原来存在但极少发生的疾病开始频繁出现,并造成严重危害,如副猪嗜血杆菌病、传染性萎缩性鼻炎和回肠炎;多种疾病导致的混合感染已经成为当前猪场中所面临的主要威胁,如高热病、仔猪原因不明性腹泻和呼吸道疾病综合征等。

当猪群发生疾病时,正确的诊断是采取进一步措施的必要前提。国内20世纪80年代之前的养殖环境中,有经验的兽医单凭对某几个特殊临床症状的观察就能确诊猪只所发疾病,但随着近年来混合感染的出现,单凭临床观察,甚至配合病理剖检都不能很有把握地诊断猪只所患疾病。为了提高诊断的准确性,为治疗和预防措施的制定与实施提供参考,一些有条件猪场开始采取与科研单位合作或自己建立实验室的方式,进行疾病的实验室诊断。但在与猪场交流过程中发现,由于实验室检验方式的专业性要求较高,因此除了一些超大规模化猪场外,很多猪场在面对如何进行实验室检验,特别是在如何解读检验报告方面,欠缺很大,甚至由此造成很多不必要的误会和对实验室检验结果的不信任。为了使大家能够对实验室检验方法有一个较清晰的认识,特别是能够正确地阅读与分析病原检验报告,笔者针对病原检验所用方法的展开讨论与分析。

病原,顾名思义即导致发病的原因,详细划分有多种类型,但目前猪场及各实验室中进行的病原检测主要是针对传染病而言,即细菌、病毒等各类微生物。虽然伴随生物技术和仪器设备

的更新换代,人们已经研究出了很多方法可以用来检测病原,但临床与科研对检测方法的要求存在显著差异,前者不仅要求所用方法要有较高的准确性,操作上必须要简单化,易于让大多数人理解和掌握。因此本文将集中于对猪场自建实验室和一些动保企业所建实验室中能够有条件使用和已经在广泛使用的方法进行探讨。从检测的项目来分,目前实验室中针对微生物检验所用的方法可以划分为直接法和间接法两种,其中直接法中有培养法、PCR法和ELISA法;间接法主要是指野毒抗体检测法。

1 直接法

直接法是指通过直接对微生物本体或其某一组分的检验,来达到测定样品中某一特定微生物的有无及其含量的一类方法。

1.1 培养法

严格来说培养法中包含对细菌和病毒等多种病原体的培养,但一般猪场所能用到的培养仅有针对细菌的培养,因此本叙述中,以细菌培养为主要对象进行讨论。临床上一个较为完备的细菌培养流程,需要配备以下几种简单设备:无菌操作台、酒精灯、接种环、培养箱、显微镜、常规染色剂及培养板,其中培养板可以购买商业化培养皿或自制。

当怀疑发病猪只存在细菌感染时,需要根据经验初步判断培养所需的特殊培养基或通用培养基,并对培养条件进行准备。将病料组织接种于培养皿时,需无菌操作,接种后的平皿应详细编号记录,并在培养过程中定期观察。一般培养24h(特殊细菌除外)即可见到有明显的菌落长出,接下来的工作就是要通过对菌落形态和细菌染色后的镜检,判断感染细菌的种类。如果有条件还可进行如

生化鉴定、动物接种实验等方法来确定。如果猪场选择的是病料送检,则收到的最终检验报告中一般都会用汉语详细说明分离到的致病菌名称,有的还会包含血清型、药敏结果等信息。这种报告在解读时非常容易,在此不做过深讨论。

培养法在很多文献资料中有详细介绍。徐引弟等^[1]采用含 NAD 和血清的 TSA 平板培养结合生化试验等方法,从收集的組織病料中分离到了常规方法较难分离的 10 株猪传染性胸膜肺炎放线杆菌;刘俊伟^[2]及李雪松^[3]等分别将疑似组织病料划线接种于含 NAD 的 TSA 平板培养,并利用染色镜检、生化试验及卫星现象等方法分离得到了副猪嗜血杆菌河南分离株和黑龙江分离株;蒋新华等^[4]对关节肿大仔猪无菌抽取关节液后,接种于含 10% 小牛血清的 TSA 平板,结合后期的生化试验、溶血现象及动物致病性测定等方法,诊断仔猪链球菌感染。

采用传统培养法进行细菌鉴定时,经验是实验能够成功及准确与否的关键因素,因为这一流程中的很多环节需要通过人的主观意识来进行评判,如细菌的生长情况、菌落特征、染色操作和显微镜检查等。为了进一步提高细菌培养检查的准确性与客观性,同时提高操作的简单性,目前已经开发出了一些细菌鉴定系统,如 Micrology 系统、Biology 系统和 API 系统等。这些系统主要是通过观察细菌在培养过程中所表现出来各项特性的观察与评分,来达到最终确认该细菌属于哪种类别的目的,有的甚至还能对细菌所属血清型进行鉴定,但结果准确性有待商榷^[5]。从应用来看,此类系统的准确性较高(血清型鉴定功能除外),且操作简单。建议猪场如果有条件,在建立自己的实验室时,还是应以购入此类系统为主。

1.2 PCR 法

PCR 法是分子生物学方法的一种,也是微生物分子生物学分析流程的关键环节。其理论依据是利用微生物核酸序列的专一性和特异性,实现对细菌、病毒、支原体等各类微生物性病原的单一或共同检测。此外,在详细了解病原体不同血清型或病原体不同变异株之间基因型差异的基础上,还可进行血清型或变异情况检测。根据测定对象及过程的区别可以分为普通 PCR 方法(针对 DNA)和 RT-PCR 方法(针对 RNA)两类。该方法操作相对

简单,但若要进行结果解读及问题分析则需要分子生物学的理论知识。

实验室利用此方法进行检测时,要根据待检发病猪只的临床症状及剖检变化确定检测方向。如果是利用商品化试剂盒,则可直接根据操作说明按步骤进行检测,直至最后结果;如果自身具备一定专业条件或待检项目无商品化试剂盒,则可以根据掌握的专业知识建立自己的检测操作及与之配套的相关标准,所建立的方法应既适合自身、准确性又高。如果是委托待检方式,由于现在猪病发生多为混合感染,所以一般每份病料的检验项目都在一个以上。而该方法的灵敏度极高,所以很多时候猪场收到的检验报告中会出现多种病原,这时就需要猪场技术人员结合发病猪只的临床表现和病理剖检及其他信息确定导致猪只发病的核心病原,从而采取针对性强的治疗和预防措施。而不能由于检验报告结论太多,单方面对检验结果和检验单位的技术能力产生怀疑。

袁翠霞等^[6]针对猪支气管败血波氏杆菌(Bb)的鞭毛基因,利用一对特异性引物建立的 PCR 方法能够扩增出长度为 237 bp 的特异性 DNA 条带。与生化方法相比,该方法快速、准确,能够显著提高临床病例的检出率。张燕霞等利用已有的北美型 PRRS 病毒基因序列分别设计了一种检测通用型引物^[7]和鉴别型引物^[8],并建立了相应的 RT-PCR 方法。前者能够实现北美型 PRRS 的普适性检测,后者能够将北美型 PRRS 的经典毒株与高致病毒株进行区分。张坤等^[9]根据仔猪腹泻病原复杂的特点,针对 3 种主要病毒性病原:流行性腹泻病毒(PEDV)、传染性胃肠炎病毒(TGEV)和 A 群轮状病毒(GAR)设计了 3 对引物,并建立了可同时进行 3 种病原检测的多重 RT-PCR 方法。对临床病料的检验结果证实,该方法与常规 RT-PCR 相比,特异性和准确性明显提高,且显著缩短检验时间。

该检测方法所需设备及试剂价格高昂,且对实验条件和实验人员要求较高。一般来说所需设备主要有 PCR 仪、电泳仪、紫外仪、超净台、低温离心机等,另外还需要建立专用的操作间,以防交叉污染和对人体产生损害。试剂方面,由于自配试剂的不稳定性,现在多倾向于使用商品化试剂盒,不过商品化试剂盒的批间差异性和品牌差异性,也给该方法的应用及结果间的比较带来困难。人员

方面,一般认为该方法能够实现流程化操作,所需人员只需能熟练操作即可。其实不然,由于该方法环节众多,且易出现假阳性、假阴性等情况,若操作人员没有一定的分子生物学知识背景,则很难对这些情况的出现给出合理解释,并提出解决方案。所以猪场想要建立自己的 PCR 诊断实验室,个人认为,首先要选好人,其次才是各类设备的采购与制度建设。

1.3 ELISA 法

ELISA 法即指酶联免疫吸附法。此方法的原理结合了抗原抗体反应的特异性与酶反应的扩增性。具体来说即抗原抗体发生结合反应时由于自身分子量较小,而使人的肉眼难以观察到其是否发生了反应及反应的程度,因此为能够对这一结合现象进行观察,人们研究出了各种方法,在这一结合反应的基础上加入酶反应即为其中的一种。因为酶发生催化反应后,其产物能够迅速增加并可以通过一定条件用肉眼就能进行观察。如果再用仪器进行测定则可以达到定量的效果。这样我们就可以通过对酶反应是否发生及其强弱程度的测定来判断抗原抗体反应的发生情况,从而实现抗原或抗体的定性及定量测定。

目前临床上能够适用于进行病原检测的此类商品化 ELISA 试剂盒并不多。据笔者了解,用于猪瘟病原检测的试剂盒在生产工艺和稳定性、准确性及灵敏度方面最为突出,也是临床上应用最多的种类。其他病原的检测,如蓝耳病、伪狂犬、乙脑、链球菌等,还停留在实验室研发阶段,尚有一些技术性问题未解决。

2 间接法

间接法即测定的核心目的是检查病原的有无,但由于没有合适的直接法或直接法操作复杂,因此通过测定其他能够反映病原的项目来判断病原是否存在。最常见的间接法测定病原是各类野毒抗体检测法,即通过对体内野毒抗体的测定来判断动物机体是否存在病原的野毒感染。具体来说即指 ELISA 方法,如伪狂犬 gE-ELISA 抗体测定法和口蹄疫 3ABC 抗体测定法等。

伪狂犬是严重危害养猪业发展的一种病毒性疾病,其主要侵害胎儿和仔猪。目前世界范围内养猪业中对伪狂犬的预防普遍使用的 gE 基因自然缺失的 Bartha K-61 弱毒疫苗。该疫苗的一个显

著优势是其基因序列中自然缺失了 gE 基因。该基因表达的蛋白与病毒的毒力有关而与病毒的增殖无关,因此缺失后的病毒毒力显著减弱而仍可以进行增殖。根据单克隆抗体原理,病毒体的每一组分均能刺激机体产生特异性的抗体。因此当猪只用缺失 gE 基因的疫苗免疫后,其体内产生的抗体中不含针对 gE 基因表达蛋白的抗体,而野毒由于没有缺失该基因所以其感染后刺激机体产生的抗体中含有针对该基因的特异性抗体,从而可以通过检测体内 gE 基因表达蛋白特异性抗体的有无来判断猪只是否感染了野毒。唐勇等^[10]利用大肠杆菌表达的 gE 蛋白经一系列纯化等工艺处理后,建立了鉴别伪狂犬野毒感染的 gE-ELISA 诊断法,实验证实其灵敏度、准确性和重复性均与国外同类产品相当。目前已经有多种进口或国产商品化试剂盒在临床上应用,有很多基于临床检测的报道中均使用该类型试剂盒^[11,12],其效果有一定差异^[13],因此在使用时应做好选择。基于伪狂犬 gE 基因缺失疫苗和 gE-ELISA 抗体检测试剂盒的配合使用,目前世界上一些国家和国内一些核心种猪企业已经实现了伪狂犬的净化。不过,在与猪场交流过程中笔者发现目前还有很多猪场不能正确解读 gE 抗体检测报告,究其原因是受人们传统思想的影响,即抗体水平越高越好,而不知道免疫过 gE 基因缺失疫苗(活苗)的猪只中,如果检测到了 gE 抗体是代表其已经受到野毒感染。

采用此类方法的关键是要有合适的基因(或蛋白)缺失疫苗与相应的抗体检测试剂盒,两者缺一不可。除上述伪狂犬 gE 抗体检测外,目前还有一些进口和国产的与相应疫苗配套使用的蓝耳病野毒抗体检测试剂盒、口蹄疫 3ABC-ELISA 抗体检测试剂盒和猪胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV-ELISA 抗体检测试剂盒等,其基本原理与伪狂犬的检测相同,只是针对的基因片段不同。猪瘟方面国外目前已经有此类疫苗与配套试剂盒在应用,但国内尚无使用。使用时,由于每种试剂盒的检测项目判断标准不一,所以猪场在自己应用测定时,应先仔细阅读其说明,并严格按照说明书要求操作与计算,以保证实验结果的准确性。

前已述及,基于病原检测的准确性诊断是采取进一步措施治疗猪病的前提。猪场不管是与科

(下转第 25 页)

猪流行性腹泻病毒 S 蛋白抗原表位区基因克隆、分析及原核表达

肖建雄, 唐志玲, 罗满林*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 从患流行性腹泻的病猪小肠中分离猪流行性腹泻病毒(PEDV), 设计一对引物用于扩增 PEDV S 蛋白的抗原表位区, 将扩增产物克隆到原核表达载体 pET-32a, 构建了重组表达质粒 pET32a-PEDV-S1; 在 IPTG 的诱导下表达, 经 SDS-PAGE 分析, Western blotting 鉴定, 结果表明该抗原表位区蛋白得到了重组表达。该研究可为 PEDV 抗原表位区的相关研究提供参考。

关键词: PEDV; S 蛋白; 抗原表位区; 原核表达

中图分类号: S852.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0017-04

Cloning and expression of antigen epitopes of spike protein of porcine epidemic diarrhea virus

Xiao Jianxiong, Tang Zhiling, Luo Manlin*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was isolated from small intestine of pigs with diarrhea, and a pair of specific primers was designed and synthesized to amplify antigenic region of the spike protein gene by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the amplified fragment was cloned into prokaryotic expression vector pET32a, gained a recombinant expression plasmid pET32a-PEDV-S1. The recombinant protein was expressed and identified by SDS-PAGE and Western blotting. The results could be helpful to the related research of PEDV.

Key words: PEDV; S protein; antigenic region; prokaryotic expression

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起猪的一种急性高度接触性肠道传染病。该病毒具有肠道组织的嗜性,主要通过肠道感染,引起猪发热、厌食、消化道黏膜发炎、呕吐、水样腹泻、严重脱水等。此病多发生于冬季12月至来年2月寒冷季节,故俗称“冬季拉稀病”。该病首次在1971年于英国发生,并于1978年在比利时和英国首次分离到病毒,确定是一种冠状病毒。随后许多国家相继报道^[1],我国于1976年发现本病^[2],并于1980年首次分离到PEDV。近两年来, PED发生率居高不下,出现混合感染的现象时有发生,给我国养猪业带来巨大的经济损失。

S(Spike)蛋白是冠状病毒外膜上最重要的一

种I型糖蛋白,负责病毒的吸附、融合和侵入宿主细胞,也是诱导宿主体液免疫反应的免疫原性蛋白。PEDV的S基因所编码的S蛋白是由1383个氨基酸组成的多肽,分子量为180~220 ku。该纤突糖蛋白以三聚体形式位于病毒粒子表面,在电子显微镜下呈现皇冠状形态。目前已经鉴定的冠状病毒S蛋白抗原表位主要位于S蛋白N端的1/2区域内^[3-5]。Chang等^[6]根据PEDV S蛋白的中和表位鉴定其S蛋白一个中和表位区(499~638aa)。孙东波等对已知冠状病毒S蛋白抗原表位和抗原表位区进行了分析,在S蛋白83~276aa区域预测到一个抗原表位区。S蛋白由于其含有PEDV主要的抗原表位,有很好的免疫原性,在机体的抗病毒免疫中起重要作用^[7-10],S蛋白被认为是发展有效抵抗

冠状病毒的主要靶抗原。

2012年8月,在广东某养猪场猪群发生了大规模的腹泻,其中以10日龄以内仔猪发病死亡率最高,达70%以上。临床表现主要为厌食、水样腹泻、呕吐。经PEDV试纸卡检测,结果为阳性,初步判定该猪场爆发了PED。对此,我们对未进行过药物治疗的患病仔猪进行剖杀,无菌采集小肠病料,进行了病毒的分离与鉴定,同时针对S蛋白抗原表位区设计了一对特异性引物,扩增该抗原表位基因,构建了重组原核表达载体,并对原核表达产物进行SDS-PAGE电泳分析及Western blot鉴定。结果显示,该抗原表位基因表达出具有免疫活性的蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

患猪的小肠,于-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

TaKaRa PrimeScript one step RT-PCR Kit; GEM-T Easy Vector T4 DNA连接酶为Promega公司产品;Biometra PCR仪为德国Biometra公司产品;Bio-RAD电泳系统为美国Bio-Rad公司产品;凝胶图像分析系统为英国UVITEC公司产品。

1.3 PEDV 目的基因的扩增与鉴定

1.3.1 病料的处理 称取待检病料置研磨器中剪碎并研磨,用含青、链霉素各1000 IU/mL的PBS作10倍稀释,置-20℃反复冻融3次,3000 r/m离心15 min;弃除沉淀后,12000 r/m离心1 min,取上清置-80℃保存备用。

1.3.2 病毒 RNA 的提取 按 TaKaRa 公司总 RNA 抽提试剂盒方法抽提病料中的病毒总 RNA。

1.3.3 RT-PCR 扩增目的片段

SF:CCGGAATTCAGCCATATTAGAGGTGGTCATGGC
SR:CCCAAGCTTTTAGTTGGAAACCCCTTACCATGC,
由上海英骏生物技术有限公司合成,用于扩增大小为603 bp的片段。以随机引物为反转录引物,用一步RT-PCR进行病毒S蛋白抗原表位基因扩增,扩增总体积为50 μL。反应体系如下:双蒸水19 μL, Buffer 25 μL,上、下游引物各1 μL,模板1 μL, PrimeScript 1 step Enzyme mix 2 μL。RP-PCR反应条件为:50℃反转录30 min,94℃预变性5 min;然后94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,共循环35次;72℃终延伸10 min,16℃保存。取5 μL扩增产物进行电泳检测,并通过凝胶成像系统摄像记录结果,余下PCR产

物于-20℃保存备用。

1.3.4 扩增片段的克隆及筛选 利用DNA胶回收试剂盒对扩增片段进行回收,参照J.萨姆布鲁克等^[9]方法,将回收产物连接到PMD18-T载体上,然后将连接产物转化至感受态细胞DH5α中,挑取白色单菌落进行增菌培养、菌液PCR鉴定、双酶切鉴定。

1.3.5 测序与分析 将筛选获得阳性克隆重组菌送上海英骏生物技术有限公司进行双向测序,其中为保证测序的准确性,每片段送2个质粒同时测序。将测序结果用DNA Star5.0软件进行序列分析和比较,并绘制S蛋白抗原表位基因遗传系统发育进化树。

1.4 PEDV S 蛋白抗原表位基因原核表达载体的构建与鉴定

将PET-32a载体用EcoRI、Hind III进行双酶切后,与阳性重组克隆质粒双酶切产物经胶回收的S蛋白抗原表位基因连接,按常规转化筛选阳性质粒,转入BL21中。经菌液PCR、双酶切鉴定构建重组表达质粒,命名为PET-32a-PEDV-S1。

1.5 PEDV S 蛋白抗原表位基因的表达及 Western blot 鉴定

1.5.1 PEDV S 蛋白抗原表位基因蛋白的表达 将重组的PET-32a-PEDV-S1菌液进行活化,加入终浓度为1 mmol/mL的IPTG在37℃条件下诱导表达。将收集到的菌液4℃、12000 r/min离心5 min收集沉淀。每管沉淀用0.2 mL双蒸水重悬后加入等量的2×SDS凝胶上样缓冲液,反复冻融3次后,沸水煮10 min,用于SDS-PAGE电泳分析,预测目的蛋白大小为38 Ku。

1.5.2 PEDV S 蛋白抗原表位基因表达物的 Western blot 鉴定 用Western blot的方法检测S蛋白抗原表位基因表达物的生物学活性。试验对照样品包括诱导后的空载体。一抗为抗His-tag小鼠单克隆抗体,二抗为羊抗鼠的HRP-IgG。用DAB显色进行观察。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物的电泳

将RT-PCR扩增产物于1%的琼脂糖凝胶进行电泳,扩增出大小为600 bp左右的清晰条带,与预期目的片段大小一致,空白对照为阴性,阳性对照为华南农业大学预防兽医教研室赠送的PEDV阳性病料(图1)。

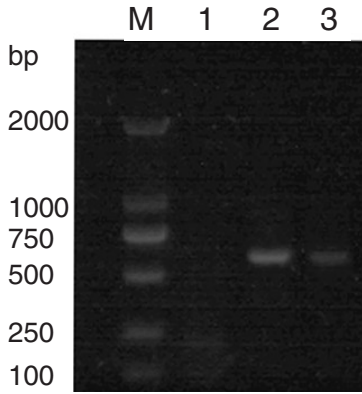


图 1 PEDV S 蛋白抗原表位区基因 RT-PCR 扩增结果
M: DL-2 000 标准分子量; 1: 阴性对照; 2: PCR 产物;
3: 阳性对照

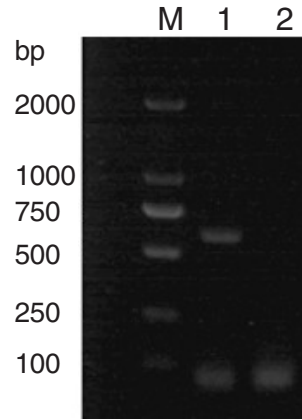


图 3 重组表达质粒 PET-32a-PEDV-S1 菌液 PCR 鉴定
M: DL-2 000 标准分子量; 1: PCR 产物; 2: 空白对照

2.2 连接、转化及菌液 PCR

将扩增的目的基因纯化后与克隆载体连接, 经氨苄青霉素筛选出阳性克隆, 再经 PCR 扩增, 得到大小约为 600 bp 的片段。

2.3 DNA 测序与序列分析

胶回收产物测序后, 用 DNASTar 软件对 S 蛋白抗原表位区基因进行序列分析。可知该抗原表位区有 582 个碱基, 编码 194 个氨基酸, 与 GenBank 已公布的 PEDV 毒株 JX435305.1、JQ771753.1、JN825712.1 等核苷酸序列相似性均为 99%, 仅在 369 位碱基上发生了基因突变, 由 G 突变为 A, CAG 与 CAA 均为谷氨酰胺, 为无义突变 (图 2); 而与 DQ862099.1 相似性最低, 为 89%, 氨基酸序列相似性为 86.1%。对大肠杆菌密码子偏嗜性分析发现, 原核表达的目的基因稀有密码子较少。

SHIRGGHGFEIGISQEPFDPSPGYQLYLHKATNGNTNATARLR
ICQFPSIKTLGPTANNDVTTGRNCLFNKAIPAHMSEHSVGGI
TWDNDRVTVFSDKIYYFYFKNDWSRVATKCYNSGGCAMPQYVY
EPTYMYMLNVTSAEDGISYQPCTANCIGYAANVFATEPNGHI
PEGFSFNWFLLSNDSTLVHGKVVSN

图 2 PEDV S 蛋白抗原表位区基因编码的推测氨基酸序列

2.4 重组质粒 PET-32a-PEDV-S1 的鉴定

将构建好的重组表达质粒, 抽提质粒, 进行菌液 PCR 和单、双酶切鉴定, 结果与预期目的片段的大小相符 (图 3、4), 表明重组表达质粒构建成功, 可用于诱导表达目的蛋白; 将 PCR 产物测序鉴定, 证明插入表达载体 PET-32a 的 S1 基因片段, 阅读框架正确。

2.5 重组质粒的诱导表达

将重组的 PET-32a-PEDV-S1 菌液经 IPTG 诱

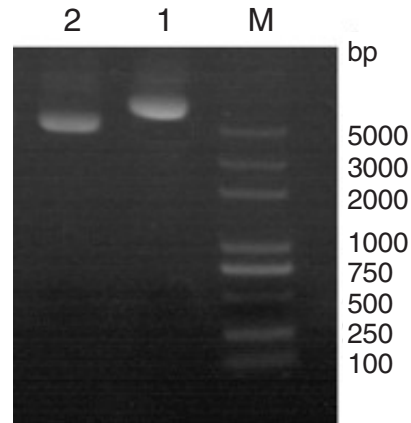


图 4 重组表达质粒 PET-32a-PEDV-S1 单酶切鉴定
M: DL-5 000 标准分子量; 1: PET-32a-PEDV-S1 单酶切
产物; 2: PET-32a

导表达, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 诱导后的菌体蛋白与未诱导的对照菌以及诱导后的空载体菌相比较, 有一条非常明显的蛋白表达带 (图 5)。参照蛋白分子质量标准, 蛋白大小约 40 Ku, 与预测的目的蛋白大小一致, 证明该重组质粒在大肠杆菌中得到了表达。确定的最优表达条件为 IPTG 浓度 1 mmol/L, 表达时间 4 h。

2.6 目的基因表达的蛋白 Western blot 鉴定

将表达的目的蛋白经 SDS-PAGE 后, 转移至 NC 膜上, 进行蛋白印迹反应。结果显示: NC 膜上出现了一条明显的棕色印迹, 而 PET-32a 空载体转化菌落和大肠杆菌 BL21 (DE3) 在相应的位置上无颜色反应条带。Western blot 证明该蛋白可被特异性的单克隆抗体所识别 (图 6)。

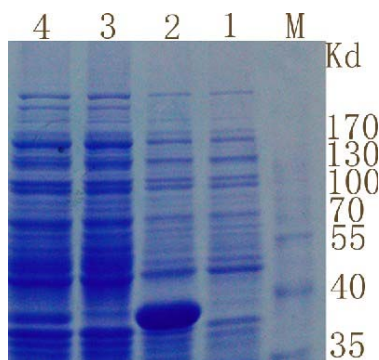


图 5 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M: 低分子质量蛋白 Marker; 1: 诱导的 PET-32a 菌体蛋白; 2: 诱导的 PET-32a-PEDV-S1 菌体蛋白; 3: 未诱导的 PET-32a-PEDV-S1 菌体蛋白; 4: 诱导的 BL21 (DE3) 菌体蛋白

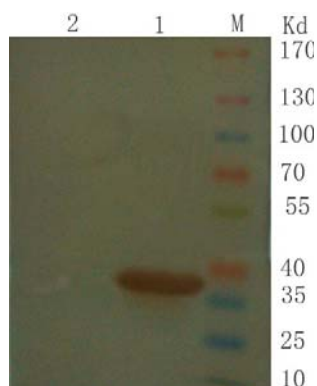


图 6 表达产物的 Western-Blot 分析

M: 预染的蛋白 Marker; 1: 诱导表达的菌体蛋白; 2: 空载体对照

3 讨论

3.1 本研究构建了 PEDV S 蛋白抗原表位区的原核重组表达质粒 PET-32a-PEDV-S1, 在大肠杆菌中获得了融合蛋白, 为下一步建立 ELISA 诊断试剂盒及 PEDV 多抗原表位的活载体病毒表达奠定了基础。

3.2 目前, 猪流行性腹泻缺乏有效的治疗方法, 研制出高效的疫苗进行免疫接种是预防该病的主要措施。表位疫苗(epitope vaccine)是利用抗原表位即抗原决定簇制备的疫苗, 也是目前有关传染病疫苗的研制方向之一。本研究扩增 S 蛋白的抗原表位区基因序列, 并进行原核表达, 为表位疫苗的研制打下基础。

3.3 通过对 S 蛋白抗原表位区基因序列的分析, 可知与 NCBI 上已公布的大多数 S 蛋白抗原表位

区基因相似性较高, 氨基酸序列改变较小。

该抗原表位区稀有密码子较少, 没有信号肽存在, 推测该片段用于原核表达效果较好, 初步证明该抗原表位区片段得到高效表达。

3.4 本研究对某猪场发病猪群通过临床诊断学, 分子生物学等方法, 证明该猪场爆发了 PED。

参考文献:

- [1] 斯特劳 B E. 猪病学[M]. 第 8 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 181-187.
- [2] Tetsuo S, Natsumi T, Atsushi K, et al. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo[J]. Virus Genes, 2011, 43: 72-78.
- [3] Yoo D, Deregt D. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization[J]. Clin Diag Lab Immunol, 2001, 8(2): 297-302.
- [4] Kida K, Hoshidatsu T, Fujii K, et al. Selection of antigenic variants of the S glycoprotein of feline infectious peritonitis virus and analysis of antigenic sites involved in neutralization[J]. J Vet Med Sci, 1999, 61(8): 935-938.
- [5] Chua M M, MacNamara K C, San Mateo L, et al. Effects of an epitope specific CD8 T Cell response on murine coronavirus central nervous system disease: protection from virus replication and antigen spread and selection of epitope escape mutants[J]. J Virol, 2004, 78(3): 1150-1159.
- [6] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. Mol Cells, 2002, 14(2): 295-299.
- [7] Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(2): 378-383.
- [8] Knipe D M, Howley P M, Griffin D E, et al. Fields Virology (5th ed)[M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 707-736.
- [9] [美]J. 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 黄培堂等译校. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 孙东波, 冯力, 陈建飞, 等. 猪流行性腹泻病毒 CH/JL 毒株 S 基因的克隆、序列分析及线性抗原表位区的鉴定[J]. 病毒学报, 2007, 23(3): 224-229.

检测猪乙型脑炎抗体胶体金免疫层析法的建立与初步应用

田纯见¹, 贾坤², 林志雄¹, 何晓明², 罗琼¹, 罗长保¹, 鱼海琼¹, 陈茹¹, 彭运平³, 吴晓薇¹
(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2. 华南农业大学, 广东 广州 510642; 3. 广州万孚生物技术有限公司, 广东 广州 510530)

摘要: 利用蔗糖密度梯度超速离心浓缩纯化 vero 细胞培养 SA14-14-2 株猪乙脑病毒灭活抗原, 进行胶体金点样和配比优化, 制备 GICA 试纸条。结果最优浓缩样品配比构成是 PBS 1.32 mL、灭活病毒液 24 mL、30%蔗糖 2.6 mL、55%蔗糖 6.6 mL; 用于胶体金偶联的抗原浓度约 2.80 mg/mL。试纸条能明显区别阴阳性血清, 阳性血清稀释 1:256 能显示条带, 优化后灵敏度达到 1:1024。与猪繁殖与呼吸综合征、猪瘟、II 型圆环病毒病阳性血清不发生交叉反应。用于检测 2 群免疫母猪抗体阳性率分别为 86% 和 100%, 说明疫苗免疫效果较好; 检测未经免疫肉猪出现阳性结果, 分别达到 38% 和 24%, 说明存在病毒隐性感染。

关键词: 乙型脑炎; 胶体金免疫层析; 超速离心; 抗体

中图分类号: S852.4³

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0021-05

The GICA method for detection of porcine Japanese B encephalitis antibody

Tian Chunjian¹, Jia Kun¹, Lin Zhixiong¹, He Xiaoming², Luo Qiong¹, Luo Changbao¹, Yu Haiqiong¹, Chen Ru¹, Peng Yunping³, Wu Xiaowei¹

(1. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China; 2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Wondofu Biomedical CO., LTD, Guangzhou 510530, China)

Abstract: Inactivated antigens of JEV SA14-14-2 strain cultivated in vero cells were purified by sucrose density gradient ultracentrifugation. After spotting tests of colloidal gold and matching optimization, GICA strip was prepared. Results showed that the optimal ingredient formulation ratio is PBS 1.32 mL, inactivated virus solution 24 mL, 2.6 mL of 30% sucrose, 55% sucrose 6.6 mL. The concentration of inactivated virus solution was 2.80mg/mL. The strip can significantly distinguish between positive and negative serum. The positive serum sample after 1:256 dilution can display distinct bands. The sensitivity is up to 1:1024 after optimization. The positive sera anti PRRSV, CSFV and circovirus II had no cross reaction. Using GIGA strips to detect sera from two groups of sows immunized with JEV vaccine, the positive rates were 86% and 100% respectively, showed good immune effect of vaccine, sera from pigs without JEV immunization the positive results were 38% and 24% respectively, indicating the presence of wild virus infection.

Key words: Japanese B Encephalitis; GICA; gradient centrifugation; antibody

乙型脑炎 (Japanese B encephalitis, JE) 是由乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 经蚊媒传播引起的重要人兽共患病。本病是我国法定报告的医学传染病和动物疫病, 也是 OIE 规定的通报性动物疫病。已经发现 60 余种动物可以感染猪乙脑病毒, 成年动物感染后往往带

毒, 成为传染来源。其中猪是病毒的主要贮存宿主, 形成猪-蚊-人的传播循环^[1]。目前全球每年猪乙脑病毒感染人数达到数万人, 我国占其中 80% 以上^[2]。猪感染后出现繁殖障碍, 产生巨大的经济损失^[3-5]。

目前, 对乙型脑炎常规检验检疫方法有

收稿日期: 2013-02-21

基金项目: 广东出入境检验检疫局科研项目 (2001GDK11)、国家质检总局科研项目 (2006IK004)。

ELISA、RT-PCR 和病毒分离鉴定等, 其操作过程复杂, 受到检测时间和试剂成本的限制。作为新一代免疫检测技术, 胶体金免疫层析法(Gold immunochromatography assay, GICA)利用胶体金(Colloidal gold)作为示踪标识物, 具有肉眼判定、快速准确和应用简便等优点, 受到广泛重视^[6-8]。但是 GICA 应用于乙型脑炎抗体检测未见报道。本研究以我国猪乙脑病毒标准毒株为抗原, 建立乙型脑炎抗体 GICA 检测方法, 为乙型脑炎血清流行病学调查和口岸快速检疫提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒

猪乙脑病毒毒株 SA14-14-2 株接种 vero 细胞, 待病变明显后将细胞反复冻融 3 次, 56℃ 30min 灭活, 经测定没有病毒活性, 安全可靠, 用于密度梯度离心。

1.2 血清

猪乙脑阳性血清由广东温氏集团研究院提供。猪繁殖与呼吸综合征、猪瘟、II 型圆环病毒病阳性血清由哈尔滨兽医研究所提供。临床检测样品由广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心保存。兔抗猪血清(二抗)由鼎国(珠海百奥)生物技术有限公司提供。

1.3 胶体金试纸条

将 0.01% 氯金酸 100 mL 加热, 煮沸后加入 2.5 mL 1% 柠檬酸三钠, 5 分钟后变为葡萄酒颜色, 冷凝后用 0.2 M K_2CO_3 调 PH 值为 6.0, 加入 0.1% PEG 20000、0.5% BSA、0.5% Tween-20、0.1% NaN_3 , 置 4℃ 冰箱保存备用。制备好的胶体金溶液与一定浓度的乙脑抗原偶联, 然后吸附在玻璃纤维膜上, 冻干后置第 II 区由硝酸纤维膜覆盖(图 1)。在 A、B 标记膜条位置分别喷上乙脑检测抗原(A)和兔抗猪抗体(B), 烘干备用。制成约 4 毫米宽的试纸条, 用塑料袋真空包装备用。

1.4 梯度系统制备和超速离心

猪乙脑灭活病毒先经离心机 Eppendorf 5415R 8000 rpm 或 Beckman J2-21 10000 rpm 离心 10~30 分钟初步除去其中的杂质。然后按一定比例组成超速梯度系统, 利用 Beckman J2-80K 和 Beckman L8-70M 超速离心机进行超速纯化乙脑病毒。离心条件分别为 4℃、50000 rpm、2h (70Ti 转

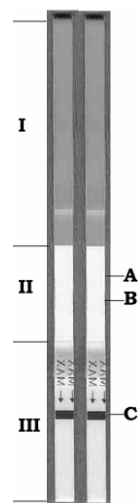


图 1 GICA 试纸条检测猪乙型脑炎抗体方法示意图

头)和 4℃、40000 rpm、2h(L8-70M 转头)。

1.5 胶体金点样和配比优化

以福林酚法测定抗原浓度, 按不同点样量确定每条试纸上抗原最低吸附量。以不同大小胶体金颗粒观察反应效果。

分别以 2[#]、3[#]、4[#] 材料用金溶胶标记。2[#] 材料的浓度稍低, 用原液包被, 3[#]、4[#] 材料则包被浓度为 1.5 mg/mL。采用正交方式优化抗原配比。与猪瘟、II 型圆环病毒病阳性血清交叉作用, 观察反应特异性。对同一份猪乙脑阳性血清, 用不同试纸条测试, 观察其重复性。

1.6 其它试剂

蔗糖, 化学纯, 以 PBS (pH 7.2) 配制成 25~60% 溶液(W/V)。

2 结果

2.1 病毒的纯化

猪乙脑病毒超离纯化按不同蔗糖梯度组成及体积配比进行(见表 1), 结果比较好的浓缩样品配比 III (PBS 1.32 mL、灭活病毒液 24 mL、30% 蔗糖 2.6 mL、55% 蔗糖 6.6 mL), 成功制备浓缩样品体系(图 2)。超离纯化前灭活病毒液先经高速离心 10000 rpm 30 分钟。超离条件是 4℃、32000 rpm 4 小时。依次分层收集第 2~12 管样品。以抗原浓度约 2.80 mg/mL, 用于偶联的胶体金颗粒约 25 纳米左右, 制备的 GICA 试纸条特异性良好, 不与猪瘟和 II 型圆环病毒病阳性血清发生交叉反应。对同一份阳性血清反复测试, 条带稳定, 重复

性良好。

血清样品由样品垫(III)(加样部位至C)向吸水垫(I)方向移动,经硝酸纤维素膜条(II)层析,与标记膜(A、B)上的抗原反应,由胶体金浓缩显色。

表 1 区带超速离心纯化乙脑病毒的蔗糖梯度组成及体积配比

成份	单位: mL		
	I	II	III
PBS	0	1	1.32
样品	3	18.3	24
30%蔗糖	3	2.0	2.6
55%蔗糖	3	5.0	6.0

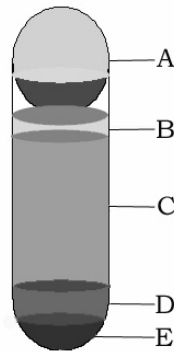


图 2 利用蔗糖梯度超离浓缩纯化乙脑病毒样品体系示意图
A: 专用离心管盖; B: PH 7.2 PBS 1.32mL; C: 灭活猪乙脑病毒液 24mL; D: 30%蔗糖溶液 2.6mL; E: 55%蔗糖溶液 6.0mL。

2.2 抗原材料配对优化

分别以猪乙脑病毒浓缩纯化 1[#]、2[#]、3[#]、4[#] 材料用金溶胶标记。1[#] 和 2[#] 材料的浓度稍低,用原液包被,3[#] 和 4[#] 材料进行稀释,最终包被浓度均约为 1.5 mg/mL,采用正交方式优化抗原配比(图 3)。结

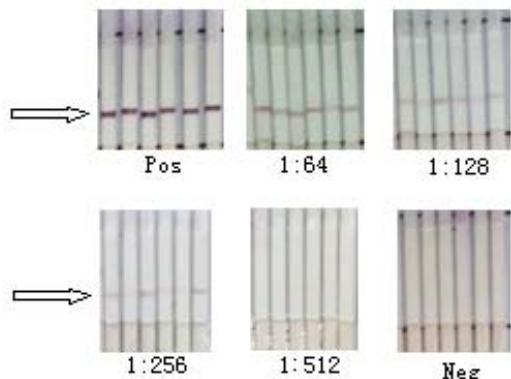


图 3 GICA 试纸条检测猪乙型脑炎抗体方法抗原正交优化结果(箭头)

果选用猪乙脑病毒浓缩纯化 4[#] 和 2[#] 材料标记,阴阳性血清均区别明显,阳性血清稀释到 1:256 也能显示条带。

2.3 灵敏度优化结果

选择 4[#] 材料包被,2[#] 材料进行标记,选用不同辅料优化试剂盒测试灵敏度(图 4),显示通过对辅料进行优化,选用 CAb 辅料可以将灵敏度优化到 1:1024。

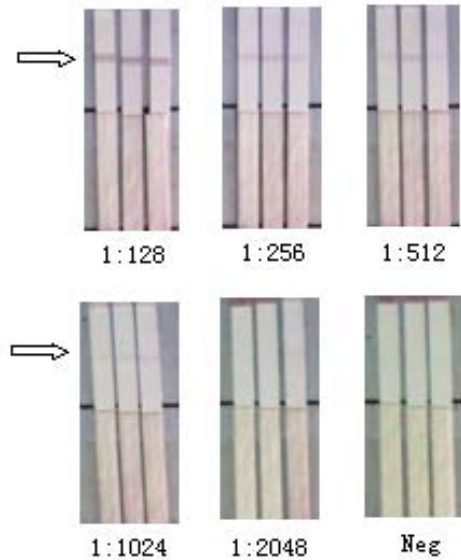


图 4 GICA 试纸条检测猪乙型脑炎抗体方法灵敏度优化结果(箭头)

2.4 试剂盒特异性检测

取研制的试纸条,分别用猪繁殖与呼吸综合征、猪瘟、II 型圆环病毒病阳性血清进行检测,结果均未出现阳性带(图 5),表明所研制的试剂盒特异性良好。

2.5 临床样品检测结果

应用 GICA 试纸条检测经免疫接种母猪和未经免疫接种肉猪的乙型脑炎抗体(表 2),两群母猪的抗体阳性率分别为 86%和 100%,说明疫苗免疫效果较好。未经免疫的肉猪出现阳性结果,分别

表 2 不同猪群的乙型脑炎抗体 GICA 试纸条检测结果

猪群	检测数量	阳性数	百分率(%)
母猪 1	21	18	86
母猪 2	16	16	100
肉猪 1	32	12	38
肉猪 2	25	6	24

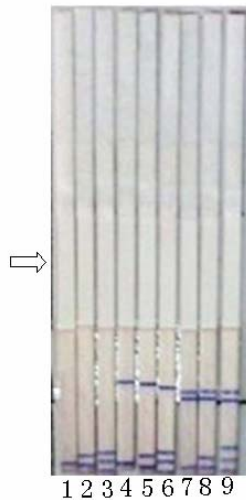


图5 GICA 试纸条检测猪乙型脑炎抗体方法特异性
试验结果(箭头)

1-3: 猪繁殖与呼吸综合征阳性血清; 4-6: 猪瘟阳性血清; 7-9: II型圆环病毒病阳性血清

达到 38% 和 24%, 说明存在病毒隐形感染。

3 讨论

3.1 GICA 研究进展及本研究成果

在我国,林志雄等^[9]最早建立 GICA 检测高致病性禽流感方法。最近几年,在动物疫病检验检疫工作中,GICA 得到空前发展。如杨明等^[10]研制出猪瘟胶体金快速诊断试纸条,王向鹏等^[11]则用于猪瘟野毒鉴别。在病毒分型诊断上,蒋韬等^[12]建立口蹄疫 O、A、Asia I 型病毒分型 GICA 方法。在猪乙脑病毒检测上,杨鹏飞等^[6]建立 GICA 方法,而华中农业大学农业微生物学实验室则分别建立 GICA 和 DIGFA 方法^[7,8]。这些进展,说明胶体金技术,特别是 GICA 方法,已经成为动物疫病诊断检测技术热点。本研究率先研制出特异性好、敏感性高的乙型脑炎抗体检测 GICA 试剂盒,填补了技术和产品空白,值得大力推广应用。

3.2 GICA 应用特点及验证

人类早在 1857 年即发现胶体金的显色作用,到 1970 年代,继荧光素、放射性同位素和酶之后,胶体金被用作免疫标记物,在医学、动植物检疫和食品安全上得到广泛应用^[8]。本研究制备的 GICA 试纸条在加样区含玻璃纤维,可吸附猪乙脑病毒包被的胶体金颗粒。反应区是硝酸纤维素滤膜(Nitrocellulose filter membrane),其中检测

线(T)用于观察猪乙脑病毒和抗体反应,质控线(C)用于观察胶体金颗粒活性程度。吸附区吸附材料,是试纸条通过毛细管垂直渗透和层折的动力,可吸附反应多余的胶体金。应用结果说明,按一定比例混合后,猪乙脑病毒在胶体金颗粒表面通过静电吸附良好,其与抗体的免疫反应性未受影响。加入抗体 5 分钟左右即反应产生红色检测带,无需前处理和洗涤,肉眼可判定结果。试纸条可随身携带,室温保存一年反应良好。反应产生的条带置 4 °C 冰箱保存 3 年未见消褪。试纸条不含有毒有害物质,不影响人畜健康,为绿色环保产品。

3.3 猪乙脑病毒抗原制备及其应用

研究显示浓度盐分、不适 PH 值和小分子单体均会影响 GICA 显色效果。目前,利用 GICA 技术检测猪瘟、口蹄疫、乙脑等抗体,是利用培养的全病毒抗原进行的,已经证实其中的杂质会干扰显色反应^[8]。一般乙脑病毒颗粒形态不均一,分子大小差异显著。本研究利用蔗糖梯度超离浓缩纯化病毒,制备大量的纯化乙脑病毒,建立乙脑抗体检测 GICA 技术,显色反应良好,取得了较好效果。

3.4 开展乙型脑炎 GICA 血清流行病学监测

研究显示,我国乙型脑炎流行呈现周期性流行特点。每次大流行后,往往有 4~5 年感染和发病低谷期^[3]。在这一时期应加强免疫接种,特别是做好儿童计划免疫,开展疫病流行病学监测,消灭蚊虫孳生,搞好养猪环境卫生。目前养猪行业应改变重种猪免疫轻肉猪免疫状况。肉猪免疫力不足,往往导致感染带毒传播,成为乙脑暴发流行的重要因素。特别在一些牲猪养殖小区,散养猪群忽视免疫接种,卫生条件差,蚊虫大量繁殖,形成重大隐患^[13]。根据广东地区乙型脑炎流行特点,应加强宣传引导,在基层养殖单位定期开展 GICA 方法监测乙型脑炎免疫和流行状况,每年 3 月开展疫苗接种和灭蚊措施,严防 6 月前后流行高峰期到来。

3.5 与 ELISA 比较及改进措施

GECA 试纸条在乙型脑炎现场初筛和大规模普查中,显示出巨大发展潜力和广阔应用前景。与常规 ELISA 方法比较,出现较高漏检率,需要加以克服^[14]。本研究通过优选临界值,提高 GICA 检测灵敏度,加强质控和标准化,在试剂盒内配置阴阳性标准品和效价测试对照样品,实现定量和半定

量测定。应用过程中应确保试剂盒不受潮,待检样品不变质,pH 值正常,测试时试剂和样品均恢复到室温,充分排除假阳性和假阴性结果干扰。

参考文献:

- [1] 陈孝明, 元文宝, 张桂红, 等. 广东省部分规模化猪场乙脑抗体的监测与分析[J]. 广东农业科学, 2010(9): 154-155.
- [2] 黄育浩, 殷自兴, 谢国怀, 等. 广东省东莞市猪乙型脑炎流行病学调查[J]. 动物医学进展, 2012, 33(7): 126-128.
- [3] 张吉凯, 赵占杰, 邵晓萍, 等. 广东省乙型脑炎流行特征及其防制策略[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 985-987.
- [4] 秦毅斌, 何颖, 何莘萍, 等. 广西猪乙型脑炎血清流行病学调查分析[J]. 南方农业学报, 2011, 42(6): 668-671.
- [5] 程振涛, 陈军义, 岳筠, 等. 贵州省猪乙型脑炎血清流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(12): 1156-1158.
- [6] 杨鹏飞, 米超, 平芮巾, 等. 快速检测日本脑炎病毒胶体金免疫层析试纸条方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2009, 32(2): 72-74.
- [7] 王祥, 陈焕春, 吴斌, 等. 猪乙型脑炎血清抗体 DIGFA 检测方

- 法的建立和利用[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(2): 200-204.
- [8] Li Y, Hou L, Ye J, et al. Development of a convenient immunochromatographic strip for the diagnosis of infection with Japanese encephalitis virus in swine [J]. J Virol Methods, 2010, 168(1-2): 51-56.
- [9] 林志雄, 田纯见, 朱道中, 等. GICA 检测高致病性禽流感抗体方法的建立[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(2): 12-14.
- [10] 杨明, 陈伯祥, 孙晓林, 等. 猪瘟胶体金快速诊断试纸条的研制[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 45(2): 34-37.
- [11] 王向鹏, 孙元, 杨增岐, 等. 检测猪瘟病毒野毒株胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(6): 441-445.
- [12] 蒋韬, 梁仲, 陈涓, 等. 口蹄疫病毒 O、A、Asia I 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3801-3808.
- [13] 林志雄, 田纯见, 洪洁心, 等. 供港澳猪场乙型脑炎血清流行病学调查及与人群感染的关系[J]. 广东畜牧兽医科技, 2006, 31(2): 41-43.
- [14] 向林远, 杜国芹. 胶体金法与 ELISA 法检测猪瘟抗体结果对比分析[J]. 湖北畜牧兽医, 2012(8): 4-5.

(上接第 16 页)

研院所合作进行代检, 还是建立自己的专有实验室, 其中关键性的一环就是要选择合适的方法, 同时要对该方法有较为全面的了解。特别是对于自建实验室来说, 应以准确、操作方便、实用为主要考虑, 而没有必要一味的追求高精尖。在诊断结果解读方面, 如果采用的是送检方式, 最好能将猪场的详细情况向检测单位说明, 以使其能提供更为精准的结果, 这样一方面可以减少不必要的误解, 另一方面猪场人员也能在与检测单位的不断交流中提升自己的专业水平。

参考文献:

- [1] 徐引弟, 王治方, 朱文豪, 等. 规模化猪场传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(7): 106-106.
- [2] 刘俊伟, 安志兴, 葛亚明, 等. 副猪嗜血杆菌河南株的分离鉴定及药敏试验[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 37-39.
- [3] 李雪松, 陈欣, 符芳, 等. 副猪嗜血杆菌黑龙江株的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(3): 236-238.
- [4] 蒋新华, 邓舜洲, 张文波, 等. 猪链球菌病原的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(12): 170-172.

- [5] 江甜, 胡智斌, 谷长勤, 等. 7 型猪链球菌的分离鉴定及特性[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(10): 1453-1457.
- [6] 袁翠霞, 罗阿东, 徐景峨, 等. 猪萎缩性鼻炎支气管败血波氏杆菌 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 29(11): 896-899.
- [7] 张燕霞, 吴发兴, 刘爽, 等. 猪蓝耳病病毒通用 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(12): 13-15.
- [8] 张燕霞, 吴发兴, 郑辉, 等. 北美型猪蓝耳病病毒鉴别 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(12): 36-38.
- [9] 张坤, 何启盖. 猪流行性腹泻病毒, 猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 1001-1005.
- [10] 唐勇, 陈焕春, 覃雅丽, 等. 猪伪狂犬病 gE-ELISA 鉴别诊断方法的建立及初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(6): 635-638.
- [11] 蒋红, 龚建军, 尹晨辉. 规模猪场成年公猪伪狂犬野毒感染抗体的检测结果初报[J]. 湖南畜牧兽医, 2011(2): 18-19.
- [12] 王劲松, 周小兵, 吴中彬, 等. 猪伪狂犬抗体检测及分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(6): 36-37.
- [13] 温清萍. 猪伪狂犬 gE 抗体 ELISA 检测在净化中的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(6): 64-65.

利用手工克隆技术培育体细胞克隆莱芜猪

周荣¹, 周秀¹, 罗绿花¹, 曾海玉¹, 麦然标¹, 余婉娴¹, 贺晓燕¹, 石俊松¹, 吴珍芳^{1,2}

(1. 广东温氏食品集团股份有限公司, 广东 新兴 527400; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为探讨手工克隆技术在克隆中国地方猪种的可行性, 本课题组利用手工克隆技术平台, 以中国地方猪品种莱芜猪的耳皮肤细胞作为核移植的供体细胞, 以体外成熟的猪卵母细胞为受体细胞, 进行体细胞克隆猪培养, 成功培育了 25 头克隆莱芜猪。表明手工克隆技术可应用于莱芜猪体细胞克隆, 为莱芜猪的保种及育种提供了新的途径。

关键词: 手工克隆; 莱芜猪; 应用

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0026-04

Breeding of Laiwu pig by handmade cloning

Zhou Rong¹, Zhou Xiu¹, Luo Lvhua¹, Zeng Haiyu¹, Mai Ranbiao¹, Yu Wanxian¹, He Xiaoyan¹, Shi Junsong¹, Wu Zhenfang^{1,2}

(1. Guangdong Wen's Food Group Co., Ltd., Xinxing 527400, China; 2. South China Agricultural University, College of Animal Science, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to make sure whether the handmade cloning (HMC) techniques were efficient in Chinese pig breeding, we used the platform of HMC techniques to produce somatic cell cloning pig. Ear Skin fibroblasts of Chinese Laiwu pig were used as donor cells and swine oocytes matured in vitro were used as receptor cells to produce somatic cell cloning pig. 25 live cloning piglets were gave birth to. The results demonstrated that HMC techniques can be applied in LW pig cloning, and provide a new way of conservation and breeding of LW Pig species.

Key words: handmade cloning; Laiwu(LW) pig; application

1997年, 世界首例体细胞克隆绵羊“多莉(Dolly)”诞生^[1], 在世界上第一次否定了“在体细胞核内基因组经历不可逆”这一传统观念, 揭示了高度分化的体细胞核在去核(去染色体)卵胞质中能重新编程, 宣告了人类进入高等动物体细胞无性繁殖(克隆)新时代, 在国际社会引起了轰动。体细胞克隆从此成为全世界科学家研究的热点。体细胞克隆的应用前景十分广泛, 一个重要的应用就是复制优良动物, 扩大动物种群^[2]。利用这一技术克隆猪, 能够大大缩短种猪选育年限, 提高育种效率, 同时降低选育成本和养殖成本。

手工克隆(handmade cloning, HMC)技术^[3-6]是一项不需要显微操作仪操作的克隆技术, 其最

大优点是降低成本, 减少高技术含量的劳动力需求。在去核时操作简便快捷且有利于进行工厂化的克隆胚生产, 其生产效率比得上甚至高于显微操作仪下的传统克隆。新的技术可加速技术转化和标准化, 最终有助于克隆的广泛应用。

HMC技术已经成功应用在牛^[7]和猪^[8]的体细胞克隆上, 并且都已经得到克隆后代。在我国深圳已经建立起手工克隆技术体系^[9], 但在莱芜猪应用方面的研究还未见报道。

本研究用中国地方猪品种莱芜猪体细胞为核供体细胞, 在屠宰场采集的卵母细胞体外成熟以后用做核受体细胞, 培养莱芜猪克隆胚胎, 手术移植后生产克隆猪, 研究HMC技术在保护地方猪种

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目(2008A024200012); 广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目(2011A020901001)

上的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

实验研究所用试剂未经特殊说明均购自 SIGMA 公司。胎牛血清(GIBCO),生理盐水(紫光古汉集团衡阳制药有限公司);细胞培养相关耗材为 Corning 公司产品;卵母细胞成熟及胚胎培养耗材为 NUNC 公司产品。洗卵液为 DPBS+PVA 液,操作液为无钙的 H-NCSU-23,成熟培养液为添加体积分数 10%猪卵泡液 的 TCM-199 液,胚胎培养液为 PZM-3 培养液。

1.2 方法

1.2.1 供体细胞的准备 采集莱芜猪耳样,经含有双抗的生理盐水冲洗,保存到含双抗的 DMEM 培养液中,用冰盒带回实验室。耳样在实验室制成细胞悬液,培养细胞,冷冻保存。在做核移植操作前 1~2 w,将供体细胞复苏培养。将传代至 5-6 代的成纤维细胞培养至 100%汇合,再接触抑制 2 天后,常规消化,离心洗涤,最后用操作液将细胞沉淀重悬,用作核供体。

1.2.2 卵母细胞体外成熟 将从屠宰场获取的卵巢放入含抗生素的 37 °C 生理盐水中,5 h 内运回实验室。用含抗生素的生理盐水冲洗 3 次,用配有 18 G 针头的 10 mL 注射器抽取 2~6 mL 的卵泡液,在体视显微镜下用自制捡卵针捡取卵丘-卵母细胞复合体 (Cumulus oocyte complexes, COCs)。用洗卵液冲洗 3 次,再用成熟培养液冲洗 2 次,然后放入已在二氧化碳培养箱内平衡 4 h 以上的成熟培养液中。在 39°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中成熟培养 42~44 h。

1.2.3 手工去核

1.2.3.1 卵母细胞去透明带 将成熟培养后的卵母细胞与 1 mg/mL 透明质酸酶混合,用移液枪反复吹打除去卵丘细胞,以胞质均匀、第一极体排出为成熟标志挑选出成熟的卵母细胞,放到操作液 TCM-199 滴中备用。

将成熟的具有第一极体的卵母细胞置于 0.05 g/L 的链霉蛋白酶中 5 s,待透明带即将完全消化后将卵母细胞移出,用操作液 TCM-199 清洗,然后放入操作液中恢复 10 min,等其变圆后备用。

1.2.3.2 手工对切去核 在 65 mm 无菌培养盘中

做数滴 30 μL 大小的含有 5 μg/mL 细胞松弛素 B 的 T20 操作液中(T 代表 TCM-199,数字代表添加的胎牛血清浓度,这里代表 20%;以下类推),每次放入 5~8 个已去掉透明带的卵母细胞,在体视显微镜下放大 5 倍以极体为参照,用切割刀 (Bioniche) 将靠近极体部分的 1/3 胞质切除,然后收集无核的剩余胞质分别用 T2 和 T10 液洗涤 3 次后暂存于 T10 中备用。

1.2.4 供体细胞与受体细胞的融合激活 采用电融合法及化学试剂辅助激活,所用的电融合同仪为 BLS-150B,采用一次性融合(一步法)。

具体操作步骤是:将半卵细胞放入含有 2 mg/mL 的植物凝集(PHA)的操作液滴中 5s,移出放入已含有供体细胞的操作液中,通过圆头细玻璃针拨动使一枚半卵细胞先与一枚供体细胞粘合,然后再与另一枚半卵细胞粘在一起,其排列顺序为:体细胞一半卵细胞一半卵细胞。粘附好的体细胞一半卵细胞一半卵细胞先在融合激活液(0.25mmol/L Mannitol,0.1mmol/L CaCl₂·2H₂O,0.1mmol/L Mg-Cl₂·6H₂O,0.5mmol/L HEPES,0.01% PVA(w/v))中平衡 2 min,再移到融合槽中进行电融合。其中半卵细胞胞质紧挨电极的一端,体细胞位于融合槽的中间。在融合槽中施加交流电场,场强为 80 V,20 μs,使已经粘成一串的 3 个细胞自动排序;施加直流电融合激活,场强为 80V,50 μs,2DC,一次可同时融合处理 5 个 3 细胞串。

1.2.5 重构胚胎的体外培养 将融合后的重构胚用 5 μg/mL CB+10 μg/mL CHX 辅助激活液处理 4 h 激活,然后将激活处理后的重构胚置于自制的 WOW(微穴)的四孔板中,每个凹穴内放入一枚去透明带的重组胚,在 39°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。培养 48 h 和 168 h 时观察记录卵裂率和囊胚形成率。

1.2.6 手术移植 重构胚胎在体外培养 5~6 d 后,将形成的囊胚移植到同期发情的受体母猪子宫内。移植方法为手术子宫角移植。术后记录受体猪的生理情况,并做好 B 超妊娠检测和受体猪饲养管理工作。

HMC 法的基本过程见图 1。

2 结果和分析

2.1 手工构建克隆胚胎

将采样获得的莱芜猪的培养细胞为核供体,

共进行 13 次手工克隆操作。共切割 6 074 枚卵母细胞, 获得 2 102 枚克隆胚胎, 体外培养 144 h 后, 获得 476 枚克隆囊胚。见表 1。

表 1 手工克隆胚胎生产效率

成熟卵细胞数	成功切割去核半卵细胞数	重构胚数 / 率(%)	卵裂数 / 率(%)	囊胚数 / 率(%)
6074	5553	2102(37.85%)	1553(73.89%)	476(22.65%)

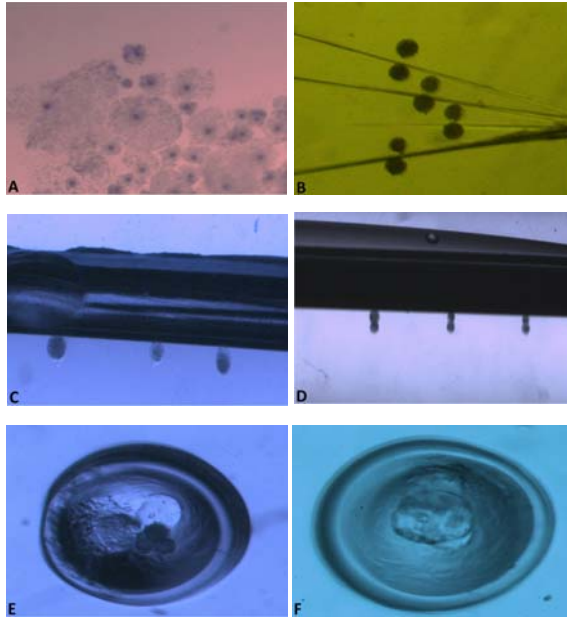


图 1 HMC 法的基本过程(图片均放大 60×)

A: 体外成熟培养 42h COCs; B: 切割去核; C: 第一次融合; D: 第二次融合; E: 卵裂的 4- 细胞; F: 囊胚;

2.2 手术移植获得莱芜猪克隆猪

在获得有足够数量的克隆囊胚之后, 采用手术移植方法移植到同期发情的受体母猪子宫内。共移植 13 头受体, 返情 4 头, 流产 2 头, 分娩 7 头, 共获得活仔 25 头, 图 2 为其中 1 窝, 4 头克隆



图 2 手工克隆的莱芜仔猪

仔猪。

3 讨论

体细胞克隆技术自建立以来, 就被克隆及胚胎学领域广泛关注。近几年多个研究小组都成功获得体细胞克隆猪^[10], 克隆效率也在不断提高, 在各个方面都表现出诱人的前景。特别是近年来发展起来的手工克隆技术, 摒弃传统的核移植操作技术程序, 利用一把特制的切割小刀达到去除卵母细胞核的目的, 不需要特殊的去核针及显微操作器材^[3], 降低了成本和高技术含量劳动力的需求。在去核时操作简便快捷且有利于进行工厂化的克隆胚胎生产, 同时降低对操作人员的技能要求, 有利于更多的实验室进行核移植研究。由于克隆动物难度高、成本大、流产率高, 这与胚胎质量、移植受体的同期性都有很大关系^[11]。对于猪来说, 传统的核移植方法更多的是移植 2~4 细胞到输卵管内, 而且至少有 4 个优质胚胎着床, 才能维持正常的妊娠^[12]。而手工克隆胚胎, 由于透明带的提前去除, 则是囊胚子宫角移植^[8]。由于移植的是无透明带囊胚, 着床的几率会更大一些。

目前传统的核移植胚胎都是手术法, 会对受体造成一定的伤害, 因此它在商业化生产中的应用受到了一定的限制。人们也在不断地探索猪胚胎的非手术法移植^[13-15], Schmidt 等^[15]利用非手术法(内窥镜、子宫颈导管)将培育到囊胚的猪胚胎进行移植, 并获得了成功。手工克隆胚胎采用的是囊胚子宫角移植, 可尝试用非手术法移植, 若两者成功结合将更加有利于克隆猪产业化应用。

本研究采用莱芜猪为核供体细胞, 同时采用简化的手工克隆技术操作体系, 旨在探讨利用手工克隆技术克隆莱芜猪的可行性探讨。体外移植实验表明: 利用手工克隆技术可成功克隆莱芜猪, 缩短了莱芜猪的育种年限, 提高了育种效率, 同时大大节约仪器成本, 为克隆技术产业化提供了可行的应用基础。

参考文献:

- [1] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380:64-66.
- [2] 张运海. 利用体细胞核移植技术生产猪克隆胚胎的研究[D]. 博士学位论文. 中国农业大学, 2005.

- [3] Vajta G, Lewis I M, Hyttel P, *et al.* Somatic cell cloning without micromanipulators[J]. Cloning, 2001(3):89-95.
- [4] Vajta G, Lewis I M, Trounson A O, *et al.* Hand-made somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro[J]. Biol Reprod, 2003, 68:571-578.
- [5] Vajta G, Peura T T, Holm P, *et al.* New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well(WOW) system[J]. Mol Reprod, 2000, 55:256-264.
- [6] Vajta G, Peura T T, Lai L, *et al.* Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning (HMC) in cattle and pig[J]. Reprod Fertil Dev, 2004b, 16:159.
- [7] Vajta G, Bartels P, Joubert J, *et al.* Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS) [J]. Theriogenology, 2004, 62(8):1465-1472.
- [8] Du Y, Zhang Y, Li J, *et al.* Piglets born from handmade cloning[J]. Reprod Fertil, 2007, 19:135.
- [9] 张鹏, 杨珍珍, 窦红伟, 等. 利用改进的手工克隆技术生产转 GFP 基因猪克隆胚胎[J]. 遗传, 2011, 33(5):527-532.
- [10] 薛振华. 克隆技术在养猪生产中的应用概况[J]. 猪业科学, 2010(7):28-29.
- [11] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407(6800):86-90.
- [12] Polge C, Rowson L E, and Chang M C. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig[J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1966, 12(2):395-397.
- [13] 桑润滋. 动物繁殖生物技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:322-388.
- [14] Ribas R, Obaek B, Ritchie W, *et al.* Modifications to improve the efficiency of zona-free mouse nuclear transfer[J]. Cloning Stem Cells, 2006, 8(1):10-15.
- [15] Schmidt M, Kragh P M, Li J, *et al.* Pregnancies and piglets from large white sow recipients after two transfer methods of cloned and transgenic embryos of different pig breeds[J]. Theriogenology, 2010, 74:1233-1240.

(上接第 11 页)

力特征,从而进一步把握毒株的流行趋势,并能从分子流行病学水平分析流行发生的原因。

新城疫毒株之间的变异主要集中在 F 蛋白在 1-32 残基的信号序列内,该区域不是功能性 F 蛋白的构成成分,它所承受的进化强度很少。在该区域的功能性 F 蛋白部分,该毒株和中国动物卫生与流行病学中心 2009 年分离到的毒株 NDV09-038 只有 2 个氨基酸的差异,它们可能来源于同一种系。毒株之间最重要的差异存在于 F 蛋白裂解位点的边界标志区,该区域的序列和毒株的毒力相关^[3]。强毒株的 112-117 残基为 RRQK(R)RF,弱毒株为 GR(K)OGRRL。对 FS/11-8 株基因推导氨基酸序列进行差异性比较(见表 1),FS/11-8 株在该区域的序列为 RRQKRF,为典型的强毒株序列。

从 FS/11-8 的 F 基因信号肽和裂解位点的序列比较系统进化树可以看出,该分离株属于基因 VII 型,这和近年来国内报道常发毒株的基因型基本一致^[4,5]。该分离株和我国常用的疫苗株,如 I 系、II 系、IV 系等,亲源关系较远,和中强毒活

苗 I 系疫苗株 Mukteswar 株的同源性也只有 81.4%。本研究结果为进一步开展该毒株的其他分子遗传特征、免疫原性、细胞信号传导等的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] [美]Y. M. Saif. 禽病学[M]. 第十二版. 北京:中国农业出版社. 2012:81-128.
- [2] Aldous E W, Mynn J K, Banks J, *et al.* A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene[J]. Avian Pathology, 2003, 32(3):239-257.
- [3] 王红宁. 禽呼吸系统疾病[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:63-97.
- [4] 秦智锋, 贺东生, 吴红专, 等. 华南地区三株新城疫地方强毒株的序列测定及其系统发育分析[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(1):67-71.
- [5] Jin S Q, Meng C C, Deng J L, *et al.* Full-length genome analysis of four genotype 3 letogenic Newcastle disease viruses isolated from different hosts[J]. Bing Du Xue Bao, 2012, 28(4):394-402.

生态化放牧与养殖结合养猪路径研究

由建勋

(山东交通职业学院, 山东 潍坊 261206)

摘要:为解决生猪规模化养殖高污染、与人争粮等造成的粮食安全和生态风险问题,推行依托林场、荒山,建设家庭猪场,实施生态化放养及农畜结合的循环经济发展,对促进经济发展和农民增收意义重大。

关键词:生态化;放牧与养殖;养猪路径

中图分类号: S815

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0030-05

今年中央一号文件提出,鼓励和支持承包土地向专业大户、家庭农场、农民合作社流转。“家庭农场”作为一个新生事物,首次出现在中央一号文件中。家庭农场作为以家庭成员为主要劳动力,从事农业规模化、集约化、商品化生产经营,并以农业收入为家庭主要收入来源的新型农业经营主体。如果单纯依靠小规模集约化农业生产经营,扣除昂贵的土地租赁、设备投入和资金使用成本后,难以取得理想收益。要使家庭农场取得规模化经济效益,必须结合发展特色农业、绿色农业、生态农业和有机农业来形成品牌,以高端品牌获取高额收益。从中国农村情况看,依托我国各地林场资源,以农户为单位建设林山生态猪场,依托猪场建设绿色有机农场,形成林、牧、农三结合的家庭农场经营模式,既能解决猪场环境污染问题,又能变废为宝地发展绿色农业,大幅提升农业经济效益,不失是实现土地从分散到集约经营的理想发展道路。

1 实施生态化放牧与养殖的现实紧迫性分析

1.1 农村耕地资源有限难以承载大量规模化家庭猪场

目前我国各地已有的家庭规模化猪场,独立自主经营,猪场建设既无圈舍标准也无用地标准。仅从我国农区生猪养殖大县猪场实际经营经验看,建1个1000头的中小规模化养猪场(含圈舍、库房、生活用房、道路、绿化带)用地1.6 hm²,

折合24亩土地。在当前我国中东部大部分农区人多地少,人均不足一亩口粮田的耕地资源稀缺状态下,标准化猪场建设动辄就是20多亩耕地的需求,需要与邻地10多户农户进行协商流转才能实现。现实中协调难度很大,难以解决。虽然,实行家庭猪场集约化养殖,在生猪疫病防治、饲养管理、养殖技术等方面有利于形成技术密集优势,经营管理科学严谨,产出效率高且养殖稳定,有利于工业饲料产品的推广,带动相关产业的发展。但对于规模化所带来的巨大用地和资金需求,面临许多严峻的困难与障碍,成为制约其发展的巨大障碍^[1]。

1.2 猪场污染治理与农区人口密集的矛盾难以解决

计划经济时代的家庭分散养殖,生猪养殖的废弃物都通过用于农田施肥及时自然消化,形成农畜良性循环。然而,农区猪场养殖的规模化、农畜分离化经营,导致了生猪粪便没有足够土地进行消纳。而农业分散经营导致的劳动力资源运用不经济,大大低于打工收益,农村青壮年劳力多数都脱离农村,在家务农的只剩下妇女与老人。由于受体力限制,老人及妇女已经习惯于使用化肥,不愿意再用畜禽有机肥,农畜脱节造成畜禽粪便这一宝贵的农业资源不能得到有效利用,失去了应用出路。而猪场集约化养殖使得猪粪尿又更加集中,于是,畜禽粪便被随意堆放、丢弃,大量有机废

收稿日期:2013-02-17

基金项目:2008年山东省软科学计划课题:诸城猪业集约经营与分散养殖深度分工协作、循环经营模式构建研究(2008RKB39);2010年山东省软科学计划课题:黄河三角洲湿地的污水生态化利用保护机制研究(2010RKB2133)

水排放到附近水沟或田土中,在雨水冲淋下进入河流和湖泊,造成水体富营养化;或渗入地下水,严重污染水体、土壤和空气质量,造成传染性疾病预防等严重的环境污染问题。在我国各地发生的恶臭、水质污染、噪声、害虫等各种畜产公害中,以生猪粪尿厌氧性分解产生的恶臭占重要地位,以粪尿造成水质污染为次。

1.3 过量用药产生的耐药细菌威胁着人类健康

兽医专家介绍:“猪跟人一样,天冷天热的时候,较容易得病”,生猪常见病无非是腹泻、伤寒和气喘。过去,导致这类常见病的大肠杆菌、链球菌感染,属于较易治疗的细菌性疾病,现在却变得难以治疗,成为猪的主要传染病。由嘉兴抛入黄浦江的大量死猪,其实就属于这类情况。而国内养猪业,由于相当多的从业人员缺乏养猪专业知识和科学养殖知识,为了见效快,在使用抗生素时,只考虑疗效,不考虑毒副作用,把几种抗生素混在一起超剂量使用。据一中美联合研究团队对分别位于北京、福建莆田和浙江嘉兴郊区的三个年出栏生猪1万头以上的大型养猪场调查,从三个猪场的猪粪便、粪便堆肥和养猪场附近使用堆肥的农田土壤样本中,共检测到149种耐药基因,其中有63种的浓度比原始森林的土壤检出量高出上百倍,有的甚至高达近3万倍;从中检测出的抗生素,涵盖了除万古霉素之外的所有主流抗生素。同样的问题在国内其他养猪场也普遍存在。过量抗生素导致了大量耐药细菌的排放,那些在猪体内抵抗住抗生素药力绞杀侥幸存活下来的细菌会进化出新的耐药性细菌。一方面,带有耐药细菌的猪肉在烹饪时,如果没有被充分加热杀死,会将耐药性“移植”给人体,使部分抗生素对人失效,严重时导致无药可医;另一方面,除很少一部分抗生素被生猪内脏器官吸收利用外,约60%~90%以原药或者其代谢产物的形式,通过尿液和粪便排泄出来,进入土壤,污染周边的地表水、地下水和饮用水源,并在环境中长期存在,最终通过直接接触或污染食物链等多种途径进入人体,对公众健康构成潜在风险与危害。

1.4 各种危险添加物对动植物和人体健康造成潜在生态风险

我国现行饲料级微量元素的国家标准过于宽

泛,饲料中重金属的来源又处于监管盲区,没有明确检测要求。饲料加工企业基于利益最大化追求,过量添加各种危险添加物已成为惯例。其实,早在70年前,科学家就发现,虽然抗生素对猪的生长没有直接作用,但在饲料中添加抗生素或者其发酵残渣,可以减少动物患病,加快生长。1950年底,美国食品药品监督管理局(FDA)首次批准在饲料中添加抗生素。从此,抗生素作为饲料添加剂在全球广泛使用。我国受土地和圈舍制约,猪圈生猪投放密度过大,拥挤的养猪场里,猪的排泄物随处可见,细菌滋生。为防止细菌导致的生猪传染病,饲料中过量添加剂成为行业惯例。虽然农业部要求药物饲料添加剂和兽药要严格执行休药期制度,即在上市前,应与最后一次用药间隔一定的时间,以使暂时残留在动物体内的药物,被分解至对人体无害的浓度。然而,由于食品监管措施执行不力,检疫没有这方面的要求,临床健康就给开一个检疫证,致使养猪户基本不理睬休药期的要求,屠宰前照常超量添加药物。对于饲料中添加的稀有元素和铜、锌等重金属元素,因铜的摄入量比需要量高出几十倍时,猪的粪便呈黑色,饲料商利用养殖户认为猪粪便越黑说明饲料消化越完全的错觉,迎合养殖户错误认识,在饲料中过量添加铜制剂。铜、锌等重金属元素很难被猪完全吸收利用,一部分超标的重金属会在猪的内脏中聚集,频繁吃动物内脏,极易摄入这部分重金属。研究发现,重金属具有富集性和累积性,用高铜添加剂饲喂动物,用其粪便做牧草肥料,可使绵羊发生中毒。还有一些养殖户为了让猪长得“皮红毛亮”,提高卖价,给猪添加有机砷制剂。砷是国际肿瘤研究机构(IARC)确认的人类致癌物之一。更为甚者,一些养殖户置国家法律法规于不顾,在饲料中添加“瘦肉精”等违禁药物。中国作为猪肉生产和消费大国,大约饲养了全球一半的生猪,庞大的规模,放大了过量 and 滥用重金属及其他有害添加剂所带来的环境“后遗症”^[2]。

2 依托生态化放牧与养殖推进猪业健康发展的路径

2.1 选育适宜野外放养的优质良种猪基地

我国生猪存栏头数多年来一直稳定在4.5亿头左右,按照一头猪平均日耗2公斤粮食计,仅养

猪消耗粮食量就远超全国城乡居民直接生活粮食消耗。为保证我国的粮食安全和猪肉供应,必须做好优良种猪的选育工作,由实力雄厚的养猪业集团通过商业化运营,优选耐粗饲、抗逆性强、生长快和适宜野外放养的生猪品种(如地域特色明显的藏猪、太湖猪、东北民猪、八眉猪等),经进一步选育,优化性能,建立优良二元及三元杂交母猪繁育基地。或选择山林集中地区已经驯化的杂交野猪及其改良猪种作为一元母猪,通过二元及三元杂交选育出杂优质种猪资源。然后利用集团公司的自属祖代养殖场和父母代养殖场,通过控股或合同建立仔猪繁育基地,为林山家庭猪场提供最受市场欢迎的无变异、不退化的优良野外放养仔猪。处于原始森林,林场面积多、资金实力雄厚、规模大的家庭猪场,也可用杂交后的二代野母猪进行繁殖,探索自繁自养、自产自销、加工增值的“一条龙”发展模式。

2.2 建立生态化林山开放饲养机制

我国的“三山六水一份田”地形地貌特征,说明土地面积十分有限,而山地资源却相对丰富,将易于放养的生猪品种放养到森林、山地、荒山进行生态环保养殖,不仅可以节约土地和粮食资源,而且可利用丰富的山林资源进行林牧结合。为充分发挥山区丘陵地区林草资源丰富的优势,应按照农牧结合、畜禽排泄与周边田地对有机肥消纳相适应的原则,推进生猪上山、养殖进山,挖掘山区、半山区林场生猪发展潜力。以龙头企业带动示范,引导中小规模家庭养猪户向林山开放式生态化养殖转变。充分利用林山空间及野菜、野果、中草药等自然资源优势,以养殖耐粗饲、抗逆性强、生长快的优质地方猪品种或杂交驯化的野猪为主导,以充分运动为保证,以少量无添加剂的粮食饲料为补充,以农畜结合自然生态循环为保障,以生产优质安全和高价猪肉为目的,建设天然富氧运动的食草绿色家庭猪场。为防止生猪对农作物及庄稼的破坏,林场四周可建立网栏格栅,使生猪在自由开放的林间自由活动,饿了自由享用山林中的青草、根茎、野菜、昆虫、灌木嫩叶、野果、中草药,渴了喝山泉水,乏了在丛林中打盹,闷了在山中嬉戏。使生猪白天充分自由的享受氧气、阳光、绿草、清泉、运动和婚配;晚上回猪舍时,清点数目,并适

量投放不含添加剂的玉米、麸皮等原生态饲料与饲草的配合食品。生猪生活在山林中,与山林形成生态循环,消除了传统猪舍的肮脏潮湿和细菌丛生的环境污染,抗病力强。运动长成的猪肉也相对紧凑,没有肥膘、低脂肪,食用更健康,更美味,更营养。通过生猪绿色生态化养殖革命,在大幅降低养殖成本,提高猪肉质量和保证猪肉安全的同时,彻底解决生猪养殖环境污染难题,实现农畜结合良性发展。

2.3 构建农畜结合生态化养种循环模式

为变废为宝地实现生态循环,对于规模较大的林山家庭猪场,要采用家庭猪场与家庭农场“结对子”的农畜结合模式,将猪舍建设在林山与农场的结合部,依托猪场产生的猪粪、尿液和废水等“三废”发展农畜结合生态化循环有机农业,以突破现行有机农业发展的肥料制约瓶颈。家庭猪场可在靠近农场的林山空地内,采用有色钢瓦做屋顶建设猪舍,周边用漏缝钢管做猪栏,修建四面通风透气良好的猪舍,使生猪夜晚也处在空气新鲜的自然环境中。在猪舍下坡及下风口处集中建设“三废”处理配套设施,每天早上待生猪放归山林后,将猪舍内粪便进行收集,堆放在干粪堆积棚内,发酵腐熟成黑色优质有机肥。养殖中每天产生的大量尿液和污水通过猪舍内收集槽,自动流入暂存池内沉淀,再通过泥浆泵将尿污水通过管道排入农场的发酵池,在发酵池内进行曝氧发酵,使其具有一定的植物营养价值后,作为液态肥料在农田灌溉时按一定比例用于农作物生产。对于规模较小或就近没有相应家庭农场进行配套的猪场,可通过在林山低洼区域的相对平缓区种植林果,构建“猪-沼-果”生态循环机制。猪的干粪经干粪池囤积发酵,用于果树施肥,尿液和废水流入沼气池,经无氧化处理后,再经管网输送到果园的液态肥存放池中,浇施果树。果园通过种植适合生猪快速生长的优质饲草,通过轮牧放养,即可以保墒优果,又可作为放养的优质饲料,一举两得。农场或果园与养猪诸要素的合理配置,实现农畜生态化良性循环,沼液肥土利环保,生产的有机蔬菜、水果和粮食营养价值高,效益突出,消除农业对化肥的投入而达到低耗、高产、优质和低污染、改良土壤的目的。沼气做饭、照明,生活方便,养殖

的生态猪肉质优价高,为开发无公害农畜产品生产,展现了广阔的应用前景。

2.4 建立高端品牌生产营销体系

利用林场、果园、荒山、荒坡进行生态化野外放养,是对传统圈养模式的突破和创新,是发展无公害生猪产业及农畜结合循环经济的良好途径。它顺应社会公众对无污染、无公害、安全、优质和营养的高质量猪肉需求日益扩大的消费趋势,真正解决猪肉食品安全问题,为市场提供高端、营养、无公害猪肉制品,同时带动高端有机蔬菜、林果和粮食等产业发展。为突出这类产自良好的生态环境下的食品价值,要按照严格的生态产业发展要求,实施统一管理运营。

2.4.1 统一注册商标,实施绿色有机食品认证 为确保种猪及仔猪来源纯正,必须实行品牌化运营管理。通过由猪业集团公司牵头成立林山猪场合作社方式,把周边林山家庭猪场组织起来,统一注册商标实施绿色有机食品认证,打造“绿色食品”品牌,保证种猪及仔猪的可追溯性,把生态猪业做成高端产业,带动更多的农民走向致富道路。

2.4.2 统一供种,保障高效生产性能 养猪业集团公司要建设自属纯正祖代养殖场和父母代养殖场,通过控股或合约建立仔猪繁育场作为合作社社员的仔猪繁育基地,为社员提供无变异、不退化、抗逆性强、耐粗饲、生产性能好、健康的优良杂交组合或配套系品牌仔猪,为林山家庭猪场根除猪源混杂效益难以保证的后顾之忧^[3]。

2.4.3 统一检疫,从源头保证生态化 统一检疫和建立养殖过程追溯体系是控制合作社社员生猪有害物质残留的重要措施和保障。要通过建立猪场养殖档案和商品猪质量检疫检测,建立跟踪体系,确保养殖全过程绿色生态,保障优质品牌生态猪质量。

2.4.4 统一防疫,降低疫病危害 疫病是家庭猪场养殖的重大威胁。凡是加入合作社的养殖户必须严格按照标准化操作规范,实施统一的、合理的免疫程序,做好预防工作。一旦发生疫病,要及时隔离、治疗,并及时上报合作社及龙头企业,由龙头企业组织专家进行疫情诊断,出具有效防治方案,由合作社快速全面推广实施。

2.4.5 统一兽药,减少危害降低用药成本 为保

证养殖户用上用量少、效果好的兽药,提高生产效益并降低用药成本和环境危害,生产出无药物残留的生态商品猪,龙头企业要联合合作社组织国内外知名兽药、疫苗厂家进行兽药招标。通过查验资质证明、权威检测报告、实际考察等方法遴选,在确保兽药、疫苗质量的前提下,通过统一招标压低价格,使养殖户用上既属于大厂家、大品牌、符合国家 GMP 标准,又比市场价低的兽药产品。

2.4.6 统一技术指导,不断提高猪场养殖水平 合作社要将社员凝聚在一起,经常组织开展饲养管理、饲料营养、生物安全、药物保健、健康养殖、自然养殖、农畜结合循环生产等方面的重点技术培训。龙头企业要开通专家热线,建立信息服务平台,定期组织技术服务专家团队下猪场,开展技术指导、技术培训、疫病监测、驻场服务。免费提供药敏试验、水质监测、消毒剂的筛选、猪舍沉降菌检测、怀孕母猪 B 超检查等专业服务,帮助制定免疫、保健、消毒、驱虫等程序,不断提高养殖户生态化循环养殖水平,增加猪场综合经济效益。

2.4.7 统一标准,提高养殖技术水平 合作社要在龙头企业指导下,建立统一的规范化养殖标准。对于不同类型的农畜结合生态化循环养殖模式,要聘请农业专家进行指导,形成标准化生产操作规范,使各类生态循环都有章可依,有据可循,全面提升农畜结合生态化循环水平,大幅提高经济效益。

2.4.8 统一价格,强化品牌优势 标准化的生态生产,养殖户有完善的饲养日志、用药记录等,养殖的商品猪是打入高端市场的稳定猪源,也是龙头企业维持品牌优势和竞争优势重要保障。为保证优质生态商品猪能够回到集团公司屠宰厂,对合作社社员的合格商品猪要按统一的高价进行收购,切实让养殖户取得高额经济效益。

2.4.9 统一资金支持,打通发展瓶颈 资金是养殖户最渴望的服务,猪业龙头企业要在依托自身优势成立“小额担保贷款公司”基础上,组织合作社与金融机构结对子,统一为养殖户进行资信评定,贷款额度授信,开展信用联保贷款服务。同时,为保证养殖户的信用联保贷款的专款专用和本息的按期归还,提高合作社的信用水平,可通过合同

方式,在商品猪统一收购时实行代扣代还。

总之,要通过建立从品牌塑造、饲料加工、种猪选育、仔猪繁殖、商品猪收购、生猪屠宰到猪制品深加工的全产业链切入,提高生态化无公害生猪的经济效益,带动林山家庭猪场健康发展,促进农畜结合生态化循环生产,从源头解决生猪养殖带来的质量安全和环境污染问题,进而促进农牧业的全面健康发展。

参考文献:

[1] 由建勋,陈留彬. 生猪产业集约与分散生态化循环经营机制研究——以诸城市生猪产业化养殖模式为例[J]. 中国畜牧杂志, 2011(6): 14-18.

[2] 李虹雨,贺涛,许竞. 莆田等地曝养猪场污染链检出 149 种耐药基因[DB/OL]. <http://news.fznews.com.cn/dsxw/2013-3-13/20133131g2rf41xdc10459.shtml>, 2013-03-13.

[3] 任相全. 激流勇进创民族品牌 一马当先做猪业精英——发挥得利斯集团产业链优势全方位打造欧得莱高端猪业品牌. 山东养猪通讯, 2009(1): 58-59.

如何缩短奶牛空怀天数

一、计步器+人工查情+预同步 提高发情鉴定准确率

鉴定牛何时发情是牛场繁殖人员最头疼的事情,泌乳牛发情期大约为 7 小时,每个发情期爬跨 9 次,每次持续大约 3 秒钟,每个查情人员大约有 27 秒的时间捕捉奶牛的站立发情。这就容易造成漏情的现象。查情可以使用两种方法:一是计步器,二是人工查情。

计步器的准确率大约为 85%,更多的需要人工查情,人工查情的时间为:早晨 6:00-7:00,中午 10:30-11:30,下午 17:00-18:00,晚上 23:00-23:30。对于查情人员的考核,每月实际发情牛头数 / (分娩 30 天后空怀牛头数 +14 月龄以上空怀的青年牛头数)——该比例不能低于 55%, 剩余 45% 的牛需要注明其原因,已配种或者其他原因,由于疾病引起的不发情需要注明治疗方案。司时还采用预同步方案:在分娩后 35-40 天注 PG, 14 天后再注射一次,这样有助于奶牛更早发情,采用此方法一般分娩后 50 多天后发情。

二、配种应注意适时输精和精液解冻

配种需要注意两个环节,一是适时输精,二是精液解冻。输精必须把握好时间,即在母牛站立发情结束或者临近结束时进行,输精时要尽量降低对奶牛的应激,因为应激会使奶牛肾上腺素分泌增加,会降低奶牛的受胎率。另外,精液解冻后,需尽量缩短精液到牛子宫的时间,时间越短越好,切忌精液解冻后再满场去找需配种的牛,那样会降低精液的活力,从而降低受胎率。

如果能尽早确定奶牛是否怀孕,既能缩短奶牛的空怀天数。最常使用的方法是:直肠妊娠检查法,经验丰富的兽医可以在配种一个月后确定是否妊娠,但是这对兽医技术要求比较高,经验欠缺的兽医可能导致胚胎死亡或流产,还有一个缺点是无法确定准确的妊娠时间。

三、良好的营养是缩短空怀天数的关键

首先,日粮中的蛋白含量不能太高,高产奶牛一般控制在 16.5% 左右,过高的蛋白会造成血液和牛奶中的尿素氮含量升高,进而降低奶牛的受胎率;其次是能量,应尽量减少高产奶牛的能量负平衡,使其保持一个良好的体况,这样能有效缩短奶牛空怀天数;第三是保证提供优质的粗饲料。

四、舒适度必不可少

如何给奶牛营造一个舒适的环境,不仅是一个动物福利问题,也跟奶牛获得高产、缩短奶牛空怀天数息息相关。方法是:牛舍内设置牛卧床、牛体刷,安装风扇和喷淋系统;运动场用发酵的牛粪做垫料,一个星期用旋耕犁翻一次,以保持运动场的松软。牛卧床用黄沙做垫料,每天有专人整理。

(来源:乳业时报)

犬瘟热病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用

余绍华¹, 罗满林¹, 苏力², 蔡勤辉², 陈武², 陈虹³, 黄晓卉³, 苏乔^{3*}
(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 广州动物园, 广东 广州 510070;
3. 中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

摘要: 根据犬瘟热病毒的核衣壳蛋白(N)基因保守序列, 设计特异性引物, 建立犬瘟热病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法。试验结果表明, 该方法敏感性比普通 RT-PCR 高出 100 倍, 重复性良好, 变异系数在 1.01% 以下, 对犬的常见病原核酸提取物检测均为阴性, 证明特异性良好。对 32 份临床样本进行检测, 27 份为阳性, 高于普通 RT-PCR 方法。试验结果表明该方法可用于犬瘟热感染情况的检测。

关键词: 犬瘟热病毒; 核衣壳蛋白(N)基因; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S85

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0035-05

Real-time RT-PCR method for detection of canine distemper virus and application

Yu Shaohua¹, Luo Manlin¹, Chen Hong³, Su Li², Cai Qinhui², Chen Wu², Huang Xiaohui³, Su Qiao^{3*}
(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China 2. Guangzhou Zoo, Guangzhou 510070, China 3. The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: On the basis of conserved sequence of nucleocapsid protein(N) gene of the canine distemper virus (CDV), a pair of specific primers was designed to establish real-time RT-PCR method for the detection of CDV. The results showed that the sensitivity of this method was 100 times higher than that of RT-PCR. This method has good repetitiveness. The coefficient of variation was less than 1.01%. Pathogens associated with canine diseases were not amplified by this method, demonstrating its excellent specificity. In clinical applications, 27 positive samples were detected out of 32 clinical specimens. These results indicated that the real-time RT-PCR can be used for the detection of canine distemper virus.

Key words: CDV; nucleocapsid protein(N) gene; real-time RT-PCR

犬瘟热是由犬瘟热病毒 (*Canine distemper virus, CDV*), 所致的一种急性高度接触性传染病, 能引起犬科、鼬科、浣熊科等多种动物发病, 发病率几乎达 100%, 易继发二次感染^[1]。目前常规的犬瘟热诊断方法有病毒分离培养、电镜观察、包涵体检查、ELISA 和普通 RT-PCR 等, 但这些方法多存在灵敏性差、特异性不强、结果判定常带有主观性等缺点, 并且耗时长, 不利于样品的快速检测^[2-3]。而本实验建立的 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 方法从样品处理到确定检测结果仅需要 3~4 h, 满足了快速诊断的技术要求。

1 材料与方法

1.1 病料来源及相关试剂

病料来源于广东省各宠物医院送检的疑似犬瘟热病例全血。Prime Script RT Master Mix Perfect Real time 反转录试剂盒, SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 试剂盒为 TAKARA 公司产品; 质粒提取试剂盒, E. Z. N. A.™ Blood RNA Kit 试剂盒为 OMEGA 公司产品。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的 (GenBank: AF305419.1) CDV N 基因序列, 利用生物学软件设计合成一

收稿日期: 2013-02-20

*: 通讯作者

基金项目: 广东省科技基础条件建设项目 (2009B060300004)

对引物, 扩增 N 基因的目的片段约为 287 bp, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, 引物序列如下:

Forward: 5' -ACAGGATTGCTGAGGACCTA-3'

Reverse: 5' -CAAGATAACCATGTACGGTG-3'

1.3 样本病毒总 RNA 的提取

按照 OMEGA 公司的 E. Z. N. A. TM Blood RNA Kit 试剂盒说明书进行操作。

1.4 标准品的制备

1.4.1 总 RNA 的反转录(RT) 使用 TaKaRa 的 Prime Script RT Master Mix Perfect Real time 反转录试剂盒, 采用 10 μL 反应体系。RT Mix(2 μL), 总 RNA 模板(2 μL), DEPC 水(6 μL); 混匀, 37℃ 反应 15min, 85℃ 放置 5 sec 终止反应, 4℃ 冷却, 所得反转录产物 cDNA 可直接用于 PCR 扩增或 -20℃ 保存备用。

1.4.2 PCR 目的基因片段的扩增 使用 2×Taq Master Mix, 采用 25 μL 反应体系。2×Taq (12.5 μL), 上游引物(1 μL), 下游引物(1 μL), cDNA 模板(1 μL), 无菌双蒸水(9.5 μL); 94℃ 预变性 5min, 然后 94℃ 40sec, 56℃ 40sec, 72℃ 40sec, 共 30 个循环, 72℃ 终延伸 10min。同时设不加模板的阴性对照。反应结束后, 进行凝胶电泳检测。

1.4.3 CDV N 基因片段的克隆与重组质粒的鉴定 PCR 产物经纯化试剂盒回收纯化后, 连接到 pMD18-T Simple 载体, 并转化至 DH5α 感受态细胞中; 将转化后长出的菌落接种于装有 5 mL 的 LB 液体培养基中 (含氨苄抗生素), 37℃ 培养 12 h, 抽提质粒。重组质粒经 PCR 鉴定后, 将阳性重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。将测序正确的阳性重组质粒作为标准品, 用紫外分光光度计测其浓度, 并换算为质粒拷贝数^[4-6]。

1.5 犬瘟热病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立

1.5.1 标准曲线的建立 标准阳性重组质粒用分光光度计测定浓度后换算为拷贝数, 经 10 倍倍比稀释后以 1.0×10⁸/μL、1.0×10⁷/μL、1.0×10⁶/μL、1.0×10⁵/μL、1.0×10⁴/μL、1.0×10³/μL 和 1.0×10²/μL 七个浓度为模板在荧光定量 PCR 仪进行反应, 得出各自的反应曲线。制作标准曲线和熔解曲线^[7]。使用 TaKaRa 的 SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time) 试剂盒。反应体

系: SYBR 5 μL, 上游引物 (P1) 0.5 μL, 上游引物 (P1) 0.5 μL, ROX 0.2 μL, cDNA 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 2.8 μL; 反应条件: 95℃, 30s; 95℃, 3s, 60℃, 30s, 40 个循环。

1.5.2 荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性检测 标准阳性重组质粒用分光光度计测定浓度后换算为拷贝数, 经 10 倍倍比稀释后以 1.0×10⁷/μL、1.0×10⁶/μL、1.0×10⁵/μL、1.0×10⁴/μL、1.0×10³/μL、1.0×10²/μL 和 1.0×10¹/μL 七个浓度为模板在荧光定量 PCR 仪进行反应, 同时以 10 倍倍比稀释后的标准阳性质粒为模板进行普通 RT-PCR 反应, 检测该方法敏感性。

1.5.3 荧光定量 RT-PCR 方法的重复性检测 以 1.0×10⁷/μL、1.0×10⁶/μL、1.0×10⁵/μL、1.0×10⁴/μL 的标准阳性重组质粒为模板, 每个稀释度做 3 个重复, 进行荧光定量 PCR 反应, 检测该方法重复性。

1.5.4 荧光定量 RT-PCR 方法的特异性检测 用荧光定量 RT-PCR 方法, 以标准质粒为阳性对照, 以灭菌双蒸水为阴性对照, 分别对犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV)、狂犬病病毒 (Rabies virus, RV)、犬腺病毒 (Canine adenovirus, CAV) 的核酸提取物进行该方法的特异性检测。

1.5.5 荧光定量 RT-PCR 方法的临床样品检测 以标准质粒为阳性对照, 以灭菌双蒸水为阴性对照, 提取临床疑似犬瘟热病料中的病毒 RNA, 进行荧光定量 RT-PCR 检测并与普通 PCR 检测对比。

2 结果

2.1 CDV N 基因的扩增

以抽提的 CDV 基因组为模板扩增 CDV N 基因, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后可见大小约为 287 bp 的目的条带, 结果见图 1。与预定的片段大小相符。

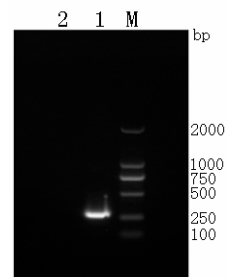


图 1 全血样品中目的基因 N1 的扩增
M: DL2000 DNA Marker 1: 全血样品 2: 阴性对照

2.2 标准阳性质粒的浓度换算

制备的标准阳性重组质粒经紫外分光光度计测得浓度为 $418 \mu\text{g/mL}$, 其拷贝数为:

拷贝数 / $\mu\text{L} = X (\text{ng/DNA}) \times 6.02 \times 10^{23} / \text{【重组质粒长度 (bp)} \times 2 \times 324.5 \text{】}$

$$= 417.56 \times 6.02 \times 10^{23} / \text{【}(2692+287) \times 2 \times 324.5 \text{】}$$

$$= 13.0 \times 10^{10} / \mu\text{L}$$

稀释方法: 取标准阳性质粒 $2 \mu\text{L}$ 加入 $24 \mu\text{L}$ 灭菌双蒸水, 即稀释为拷贝数 $1.0 \times 10^{10} / \mu\text{L}$, 随后取稀释好的质粒 $2 \mu\text{L}$ 加入 $18 \mu\text{L}$ 灭菌双蒸水, 即稀释为拷贝数 $1.0 \times 10^9 / \mu\text{L}$ 。依次类推, 10 倍比稀释。

2.3 荧光定量 RT-PCR 方法标准曲线及熔解曲线的建立

标准阳性重组质粒经 10 倍比稀释后, 以 $1.0 \times 10^8 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^2 / \mu\text{L}$ 七个浓度为模板在荧光定量 PCR 仪进行反应, 得出各自的反应曲线, 制作标准曲线 (图 2) 和熔解曲线 (图 3)。从标准曲线可知荧光定量 RT-PCR 在 $1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^2$ 拷贝 / 反应之间呈现良好的线性关系, 相关系数为 0.9963, 得到线性关系曲

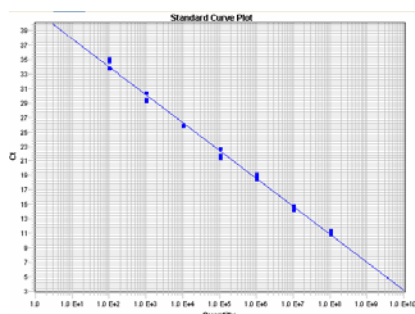


图 2 荧光定量 RT-PCR 检测 CDV 标准品标准曲线

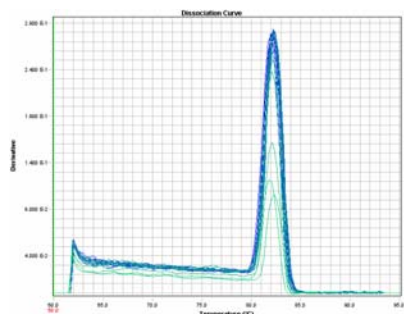


图 3 荧光定量 RT-PCR 检测 CDV 标准品熔解曲线

线表达式 $y = -0.26x + 10.808$, x 为待测样品 Ct 值, 可从仪器上读取, 代入公式即可得出初始拷贝数。

2.4 荧光定量 RT-PCR 方法敏感性检测

以 10 倍比稀释的标准阳性重组质粒为模板, 分别进行普通 RT-PCR 反应和荧光定量 RT-PCR 反应, 比较两种方法的敏感性, 结果见图 4、图 5。由此可知, 荧光定量 RT-PCR 方法最低检测限为 $1.0 \times 10^2 / \mu\text{L}$, 普通 RT-PCR 方法最低检测限为 $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 。前者敏感性比后者高出 100 倍。

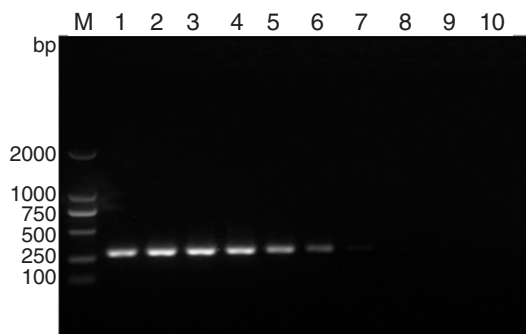


图 4 普通 RT-PCR 方法的敏感性检测

M: DL2000 DNA Marker; 1: $1.0 \times 10^{10} / \mu\text{L}$; 2: $1.0 \times 10^9 / \mu\text{L}$; 3: $1.0 \times 10^8 / \mu\text{L}$; 4: $1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$; 5: $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$; 6: $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$; 7: $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$; 8: $1.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$; 9: $1.0 \times 10^2 / \mu\text{L}$; 10: $1.0 \times 10^1 / \mu\text{L}$

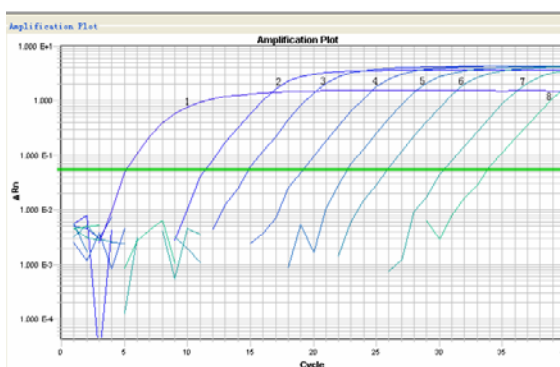


图 5 荧光定量 RT-PCR 方法的敏感性检测

1: 阳性对照; 2: $1.0 \times 10^8 / \mu\text{L}$; 3: $1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$; 4: $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$; 5: $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$; 6: $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$; 7: $1.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$; 8: $1.0 \times 10^2 / \mu\text{L}$

2.5 荧光定量 RT-PCR 方法重复性检测

以 $1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 的标准阳性重组质粒为模板, 每个稀释度做 3 个重复, 进行荧光定量 RT-PCR 反应, 检验该方法重复性, 结果见表 1、图 6。

2.6 荧光定量 RT-PCR 方法特异性检测

表 1 荧光定量 RT-PCR 方法重复性检测

质粒浓度	$1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$	$1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$	$1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$	$1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$
重复一	14.872	18.759	21.781	25.901
重复二	14.575	18.945	21.605	25.989
重复三	14.744	18.802	21.865	25.855
平均值±标准差	14.73±0.149	18.835±0.097	21.75±0.133	25.915±0.068
变异系数	1.01%	0.517%	0.61%	0.263%

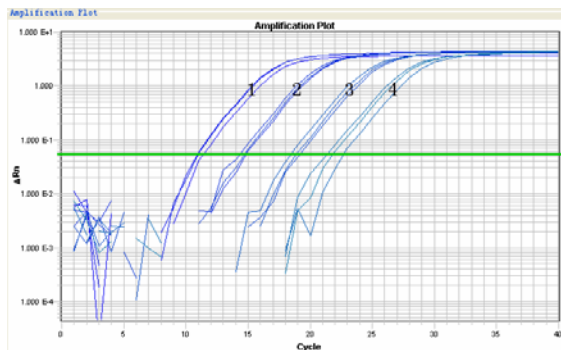


图 6 荧光定量 RT-PCR 方法的重复性检测

1: $1.0 \times 10^7 / \mu\text{L}$ 2: $1.0 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 3: $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$
4: $1.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$

以标准阳性重组质粒为阳性对照,以灭菌双蒸水为阴性对照,分别对犬瘟热临床病料,犬细小病毒(Canine parvovirus, CPV)、狂犬病病毒(Rabies virus, RV)、犬腺病毒(Canine adenovirus, CAV)的核酸提取物进行该方法的特异性检测,除标准阳性重组质粒为阳性外,其余病毒核酸提取物和灭菌双蒸水检测结果均阴性,如图 7。

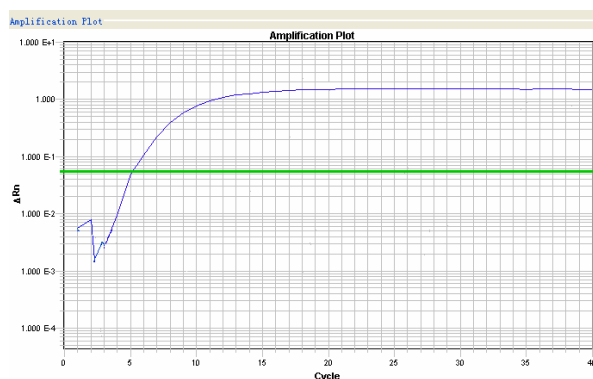


图 7 荧光定量 RT-PCR 方法的特异性检测

2.7 荧光定量 RT-PCR 方法临床样品检测

对临床疑似犬瘟热病犬的 32 份血样用该方法进行检测,检出阳性血样 27 份,阳性率 84.4%;该

方法检出的阳性血样和阴性血样再用普通 RT-PCR 方法检测,其中荧光定量 RT-PCR 检测为阳性的血样中有 4 份为阴性,荧光定量 RT-PCR 检测为阴性的血样,普通 RT-PCR 检测也为阴性,具体结果见表 2。

表 2 光定量 RT-PCR 和普通 RT-PCR 对临床疑似病例的检测结果

检测方法	荧光定量 RT-PCR	普通 RT-PCR
样品份数	32	32
阳性份数	27	23
阳性率(%)	84.4(27/32)	71.9(23/32)
阴性份数	5	9
阴性率(%)	15.2(5/32)	28.1(9/32)

3 小结与讨论

本实验建立了犬瘟热病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法,能准确检测犬瘟热病毒。该方法敏感性比普通 RT-PCR 高出 100 倍;重复性良好,变异系数在 1.01% 以下;对犬的常见病原及猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸提取物均未检测出来,特异性良好;标准曲线相关系数是 0.9963,说明该方法定量准确,灵敏度高。

目前普遍使用的实时荧光定量 RT-PCR 包括探针类和非探针类 2 种。探针类是以 TaqMan 探针为代表,利用与靶序列特异杂交的探针来指示扩增产物的增加,该方法的特异性非常好,但比较昂贵;非探针类则是利用一种能与双链 DNA 结合发光的 SYBR Green I 荧光染料与双链产物结合后,会发出强烈的荧光信号,根据荧光信号的增强来检测 PCR 扩增产物的增强。与 TaqMan 探针相比,SYBR Green I 没有特异性,只要结合任意 DNA 双链就会发光,因此不需要设计探针引物,具有较好的通用性,降低了检测

成本;与普通 RT-PCR 法相比,SYBR Green I 荧光定量法特异性更强,PCR 污染的可能性更低,自动化程度更高^[8-10]。

参考文献:

- [1] 邢明伟,曾祥伟,柴洪亮,等. SYBR Green I 荧光 RT-PCR 法快速检测毛皮动物源犬瘟热病毒[J]. 中国兽医学报, 2010(5): 597-601.
- [2] Elia G, Decaro N, Martella V, et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 136(1-2): 171-176.
- [3] 苏建青, 郑学星, 候小强, 等. TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 诊断犬瘟热病毒方法的建立[J]. 中国农学通报, 2007(11): 33-37.
- [4] 黄国君, 岳华, 杨发龙, 等. SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测犬瘟热病毒方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2008(6): 450-454.
- [5] 许红丽, 易立, 王建科, 等. 荧光定量 RT-PCR 法对犬瘟热病毒 PS 株感染犬血清和粪便中病毒的检测[J]. 中国预防兽医学报, 2012(1): 49-52.
- [6] 吕品, 胡传伟, 谢之景, 等. TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测犬瘟热病毒方法的建立与初步应用[J]. 兽类学报, 2007(3): 293-297.
- [7] 邵四海, 孔繁德, 吴德峰, 等. SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测犬瘟热方法的建立和应用[J]. 生物技术通报, 2008(1): 181-183.
- [8] 王君玮, 孙承英, 姜平, 等. Real-time TaqMan RT-PCR 快速检测犬瘟热病毒方法的研究[J]. 现代生物医学进展, 2007(2): 265-268.
- [9] Józwiak A, Frymus T. Comparison of the Immunofluorescence Assay with RT-PCR and Nested PCR in the Diagnosis of Canine Distemper[J]. Veterinary Research Communications, 2005, 29(4): 347-359.
- [10] Li JZ, He HB, Xia X Z, et al. Establishment and application of reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of canine distemper virus [J]. Chinese Journal of Virology, 1999, 15(2): 180-184.

2013“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,本刊决定评选 2013 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2014 年第 1 期公布。

1、**评选范围:**本刊 2013 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文 16 篇,分设一等奖 2 篇、二等奖 4 篇、三等奖 10 篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:**总奖金 20000 元,由广东永顺生物制药股份有限公司赞助。其中一等奖奖金 2000 元/篇;二等奖奖金 1500 元/篇;三等奖奖金 1000 元/篇。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2013 年 1 月 18 日

犬附红细胞体病例分析

谢金富¹, 张 洋²

(1.广州市高级技工学校, 广东 广州 510410; 2.广州雷米高宠物医院, 广东 广州 510410)

摘要: 采用鲜血压滴标本法结合末梢血液涂片染色法, 检测 120 只犬感染附红细胞体的情况, 结果显示 80 只犬呈阳性感染, 阳性率为 66%。对其中 30 只发病症状明显的阳性患犬进行血液生理指标测定, 患犬表现出不同程度的红细胞总数、红细胞压积、血红蛋白下降; 总胆红素、谷丙转氨酶与谷草转氨酶升高。患犬发病时以高热、贫血、黄疸为主要症状, 部分患犬继发消化道或呼吸道症状。

关键词: 犬; 附红细胞体; 感染率; 临床症状

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0040-04

Analysis of Canine Eperythrozoonosis Cases

Xie Jinfu¹, Zhang Yang²

(1.Guangzhou Senior Technical School, Guangzhou 510410,China; 2.Guangzhou Ramical Animal Hospital, Guangzhou 510410,China)

Abstract: Detection of canine eperythroozoon was carried out using blood tableting and blood smears. The results shown that 80 of 120 dogs were eperythroozoon positive, and infection rate was 66%. Blood physiological indexes of 30 positive cases which had obvious clinical symptoms shown that red cell count, hematocrit and hemoglobin dropped down by different degrees; but indexes of total bilirubin, glutamic-pyruvic transaminase and aspartate amino-transferase rose up. The main symptoms in the positive cases were high fever, anemia and jaundice. Besides, in some cases occurred secondary infection in digestive tract or respiratory tract.

Key words: canine; Eperythrozoonosis; infection rate; clinical symptom

附红细胞体病, 是由立克次体目中的附红细胞体寄生于动物血液, 游离在血浆中或附着在红细胞表面所引起的一种人兽共患传染病。由于附红细胞体寄生的宿主广泛, 我国牛、羊、猪、兔、驴、骡、鸡、鼠等均有此病报道。在犬上, 1990 年我国首次报道本病的发生。

本病主要发生于温暖季节, 夏季多发。吸血蝇类或蚊虫叮咬, 营养不良, 气候突变等应激因素都可诱发本病, 亦可经胎盘或口传播, 还可以通过接触和被污染的医疗器械传播。发病时以高热、贫血、黄疸为主要特征。由于本病对养犬业危害严重, 且犬只与人类接触密切, 因此应当加以重视。

2012 年 5 月至 6 月中下旬, 广州某贵宾犬饲养场先后有近百条贵宾犬出现体温升高至 40~

41 °C, 剧烈干咳, 黄疸, 食欲减退, 呕吐、腹泻等症状, 且部分犬食欲废绝, 经诊断为犬附红细胞体病。现将此发病、诊断、治疗等过程报告分析如下。

1 流行病学

2012 年 5 月 9 日, 该贵宾犬饲养场出现个别犬干咳, 食欲减退, 体温升高至 40 °C 以上。饲养场兽医最初怀疑是感冒引起的高热及呼吸道症状, 采取退烧、止咳等对症治疗措施。5 月 13 日患犬临床症状非但没有缓解, 而且新发患犬数量超过 20 只, 并出现死亡病例。5 月 16 日患犬数量突破 50 只, 死亡 8 只, 患犬只出现食欲减退等症状。此时饲养场场主意识到问题的严重性并向本校动物医院转诊求助。

笔者亲临该犬场发现犬舍建设简陋, 犬只来源复杂, 场地相对狭小, 饲养密度大, 通风不良, 舍内温度明显高于舍外温度。此外, 舍内粪便堆积, 卫生条件恶劣, 蚊虫较多。消毒制度不完善, 消毒措施有限。

2 临床症状

患犬精神沉郁, 食欲废绝, 被毛粗乱, 体格消瘦, 40℃以上高热稽留不退, 咳嗽剧烈, 有脓性或非脓性鼻分泌物。患犬可视粘膜苍白, 贫血; 血液稀薄, 血凝时间延长。部分患犬继发肠炎下痢, 呕吐, 粪便带有粘液和血液。病情严重者有黄染, 尤其腹部皮肤黄染明显, 前肢有坏死斑, 皮肤缺乏弹性, 尿量少且呈棕红色。

3 病理剖检

对病死犬进行剖检, 全身贫血且黄疸, 尤其皮下脂肪黄染明显, 肌肉色泽变淡, 粘膜和浆膜苍白且黄染(见图1)。肺脏充血; 脾脏肿胀、质脆、有出血点; 肾皮质有淤血斑或出血点; 胃肠粘膜水肿、充血, 有出血点及局限性溃疡(见图2); 肝脏肿大且呈土黄色; 淋巴结肿胀, 尤其颌下淋巴结、肺门淋巴结和膈淋巴结肿胀明显, 纵向切开呈土黄色。



图1 皮肤及皮下组织黄染, 心包膜轻微黄染, 肺气肿, 肝脏有块状黄染区



图2 肾脏皮髓质全部黄染, 肠黏膜有少量黄染

4 诊断

4.1 临床诊断

根据上述临床症状和病理变化, 结合流行病学可以初步诊断为犬附红细胞体病。

4.2 实验室诊断

4.2.1 血液压滴片镜检 采集患犬耳静脉血1滴滴在载玻片上, 加等量的生理盐水稀释, 制成压滴片。先用低倍镜(40倍), 待发现可疑红细胞再转用高倍镜检查。高倍镜(400倍或1000倍)下可见红细胞的形状呈锯齿状、星芒状、皇冠状等多形性, 表面有球形、点状或其它颗粒状的附红细胞体。见图3。每个视野中都可见到被附红细胞体附着着的红细胞, 有的附红细胞体附着着的红细胞甚至占到全部视野中红细胞的90%以上。

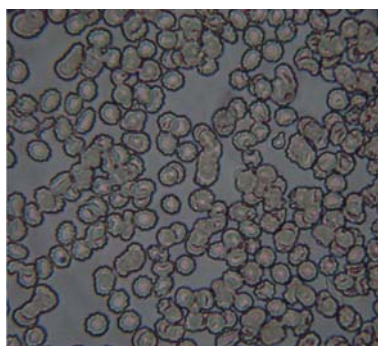


图3 血液压滴片镜检下锯齿状的红细胞及附着其上的附红细胞体

4.2.2 血涂片瑞氏染色镜检 采集新鲜血液1滴滴在载玻片上, 立即涂片, 干燥后进行瑞氏染色。镜检可见附着于红细胞或游离于血浆中的附红细胞体被染成蓝色或淡蓝色, 被附红细胞体附着着的红细胞如呈锯齿状。见图4。附红细胞体大小

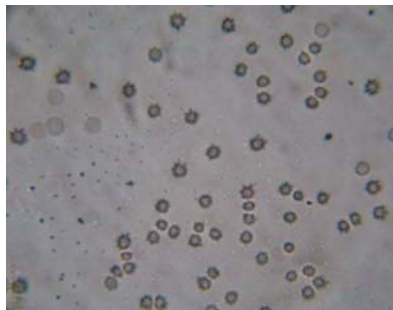


图4 血涂片镜检下锯齿状的红细胞及附着其上的附红细胞体

不等,有折光性;血浆中的血小板被染成紫红色,区别于附红细胞体。

发现红细胞有附红细胞体附着或有附红细胞体游离于血浆中者即为阳性,无附红细胞体附着或血浆中无附红细胞体游离者即为阴性。采集疑似病例血液样本 120 例,通过镜检确认 80 例有附红细胞体存在,感染率达 66%。抽取其中临床特征明显的 30 例患犬进行血常规检查、血液生化检查、X 线片检查。

4.2.3 血常规检查 仪器使用美国爱德士激光流式五分类分析仪。感染附红细胞体的犬均表现出不同程度的红细胞压积、血红蛋白、红细胞总数下降,嗜酸性粒细胞、淋巴细胞略低于正常值,其中嗜中性粒细胞增高。见表 1。

表 1 30 例患犬血常规检查结果

项目	结果
RBC($\times 10^{12}$)	4.76 \pm 0.10
HCT(%)	36.82 \pm 1.29
HGB(g/dL)	11.03 \pm 0.34
RETIC(K/uL)	8.74 \pm 0.35
WBC($\times 10^9$)	23.40 \pm 0.86
NEU($\times 10^9$)	19.82 \pm 0.87
LYM($\times 10^9$)	1.61 \pm 0.13
MONO($\times 10^9$)	0.91 \pm 0.10
EOS($\times 10^9$)	1.02 \pm 0.12
BASO($\times 10^9$)	0.05 \pm 0.00
PLT(K/uL)	201.83 \pm 13.85

4.2.4 血液生化检查 仪器使用美国爱德士干式血液生化分析仪。血清总胆红素、丙氨酸转氨酶和碱性磷酸酶升高,血糖降低。见表 2。

4.2.5 X 线片检查 对于呼吸道感染病例,拍摄胸部 X 线片,观察气管、支气管、肺脏渗出性质及蔓延情况。见图 5。对于消化道感染病例,拍摄腹部 X 线片,观察各肠段情况。见图 6。

5 治疗

5.1 对于患病初期的犬只,口服多西环素 10 mg/kg. bw,每天 2 次。3 d 可获得疗效,咳嗽、发烧症状减轻。

5.2 患病时间长、食欲废绝、呕吐、腹泻症状者,易造成水和电解质失衡,在对症治疗的基础上,进

表 2 30 例患犬血液生化检查结果

项目	结果
ALT(U/L)	285.57 \pm 32.10
ALKP(U/L)	250.30 \pm 20.41
TP(g/L)	59.50 \pm 2.46
ALB(g/L)	29.93 \pm 1.57
TBIL(umol/L)	18.20 \pm 1.81
CREA(umol/L)	102.33 \pm 6.97
UREA(mmol/L)	4.91 \pm 0.36
PHOS(mmol/L)	1.64 \pm 0.14
CHOL(Mmol/l)	4.58 \pm 0.35
Ca(Mmol/l)	2.43 \pm 0.08
GLU(Mmol/l)	3.59 \pm 0.13



图 5 附红细胞体感染合并呼吸道感染 X 线片



图 6 附红细胞体感染合并消化道感染 X 线片

行强心、补液,纠正酸碱平衡。

5.2.1 输液量的计算 判断患犬脱水程度。手指拎起皮肤,依据皱褶恢复时间,分别确定患犬是轻度、中度、重度脱水,分别以每公斤体重 24 小时 30 mL、50 mL、70 mL 补液。补液过程中或补液后,如果患犬出现排尿是输液量补足的表现。

5.2.2 补钠、补糖 以 0.9%氯化钠添加抗生素和 5%葡萄糖溶液输液,配合维生素 C 40 mg/kg. bw、维生素 B₆ 一次量 80 mg 和 ATP 一次量 2 mL、辅酶

A 100 U。

5.2.3 止咳平喘 口服咳特灵, 成年犬一次1粒, 一天2次;阿奇霉素片, 一次10 mg口服;皮下注射氨茶碱或喘定一次量10 mg;选用氨茶碱100 mg、地塞米松5 mg、鱼腥草2 mL、糜蛋白酶2 000 U雾化, 咳喘严重者一天2次雾化。

5.2.4 根据机体贫血程度, 肌肉注射适量维生素B₁₂ 0.02 mg/kg. bw, 一天1次;口服法国威隆补血肝精, 每次半滴管;补充复合氨基酸。

5.2.5 根据患犬呕吐、腹泻程度, 皮下注射胃复安0.1 mL/kg. bw、654-2 0.2 mL/kg. bw、维生素B₆ 一次量80 mg, 西咪替丁10 mg/kg. bw, 口服乳酸酶生, 一次量0.3 mg、硫糖铝一次量500 mg等保护胃肠道粘膜。

5.2.6 防止继发感染 选用头孢曲松50 mg/kg. bw, 咳嗽严重者使用阿奇霉素, 静脉注射时需缓慢, 以防引起或加重呕吐。

5.2.7 保肝、护肝、去除黄疸 对皮肤和眼结膜出现黄染的病例使用久克肝0.1 mL/kg. bw, 肝泰乐, 严重者可使用茵栀黄口服去黄。

5.3 护理:对呕吐、腹泻严重的犬, 需禁食、禁水, 待呕吐、腹泻症状好转后逐渐增加食物供应量, 防止继发感染。注意在恢复期, 要控制饮食, 增加营养丰富的食物。

6 讨论

6.1 诊断

对于附红细胞体病的诊断, 自1928年首次报道附红细胞体至今, 其诊断方法在不断的摸索中前进, 目前已报道的诊断方法有电镜法、涂片染色法、鲜血压片镜检法、血清学诊断法和PCR检测法^[1, 2]。本例诊断主要通过鲜血压滴标本法结合末梢血液涂片染色法观察异常红细胞及附红细胞体的存在来确诊。陈明^[3]及王永等^[4]报告称, 用1%盐酸使红细胞破裂溶血后, 血液中附红细胞体的运动活力不受影响;滴加0.1%碘溶液后, 附红细胞体运动停止, 且不被碘着色, 用生理盐水洗涤后, 活动力不恢复。这是附红细胞体的固有特性, 可以同其他血液寄生微生物区别开来。

6.2 治疗

附红细胞体病多呈隐性经过, 在应激条件下出现急性临床症状。治疗附红细胞体病, 首选药物为四环素类药物^[5], 新砷钠明、贝尼尔、阿维菌素、咪唑苯脲也有较好疗效。有报道称应用青蒿素、大蒜素的疗效也较好^[6]。在治疗过程中, 应判断是否有其他混合感染情况而选择适当药物联合用药。

综合上述治疗方法, 通过80例患犬治疗效果的统计结果表明, 3天可缓解本病的高热、咳嗽、呕吐、腹泻等症状。皮肤黄染的病例, 采用保肝、护肝、去黄的措施后, 20例病情缓解, 但黄染的皮肤并未能完全消退。感染严重者, 如血红蛋白浓度低于50 g/L, 伴有心率不齐、心内杂音和呼吸困难等症状, 预后不良。

6.3 预防

此次发病, 涉及犬场大部分犬只。通过流行病学原因调查分析, 犬场犬只来源复杂, 主要来源于成都、天津、沈阳等地, 免疫驱虫情况不明。尽管到饲养场后做过常规驱虫, 但是饲养环境恶劣, 应激反应大, 加上天气炎热, 蚊虫较多, 导致犬只大规模发病。为有效控制疾病的发展, 消除发病原因, 隔离犬只以减少同笼犬只的数量;犬舍安装驱蚊灯驱蚊, 增加通风;清理犬舍, 使用2%~3%烧碱溶液消毒犬舍;饮水添加黄芪多糖、电解多维, 降低应激。

参考文献:

- [1] 杨华裴, 标高峻. 人类附红细胞体3种临床检验方法的比较及评价[J]. 江苏预防医学, 1998(4): 13-14.
- [2] 赵凤菊, 李井春, 韩庆功, 等. 动物附红细胞体病诊断方法的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(4): 677-678.
- [3] 陈明, 黄维义, 莫宗成, 等. 附红细胞体感染的诊断研究进展[J]. 广西畜牧兽医, 2006, 22(2): 89-90.
- [4] 王永, 孟炜, 王振勇. 附红细胞体病实验室诊断方法概述[J]. 吉林畜牧兽医, 2005(10): 23-24.
- [5] 全炳昭, 陈如圣, 郭向东, 等. 犬附红细胞体病的治疗药物在临床应用与分析[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2011(1): 33-36.
- [6] 成宜茂. 3种药物治疗犬附红细胞体病的对比试验[J]. 当代畜牧, 2008(1): 46.

兽医微生物学与免疫学实验综合教学体系的构建

罗永文, 郭慧霞, 琚春梅, 陈金顶, 郭霄峰*
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 设计性和开放式的实验教学模式是各农业高校在建立独立的实验教学体系改革中的一种探索。为了满足高素质兽医人才的培养需求, 本文在整合和优化兽医微生物学与免疫学实验内容的基础上, 对如何改变验证性的传统教学模式, 构建研究设计性综合实验教学体系进行了探讨。

关键词: 兽医微生物学; 兽医免疫学; 实验教学改革

中图分类号: S85 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2013)02-0044-04

A comprehensive teaching system of veterinary microbiology and immunology experiment

Luo Yongwen, Guo Huixia, Ju Chunmei, Chen Jinding, Guo Xiaofeng*
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The designing and open experimental teaching model is a reform trend in agricultural universities' establishments of independent experimental teaching system. Based on the integration and optimization of the experimental teaching contents of Veterinary Microbiology and Immunology, we explore a practice teaching course that can reform the traditional mode of confirmatory teaching and build a comprehensive experimental teaching system, to meet the needs of training veterinary technicians with high quality.

Key words: Veterinary Microbiology; Veterinary Immunology; Experimental teaching reform

随着微生物学与免疫学学科知识的不断扩充和更新,《兽医微生物学》和《兽医免疫学》逐渐发展成兽医学专业两门重要的专业基础课,它们相辅相成并相互融合促进。兽医微生物学与免疫学实验技术和方法已广泛渗透至兽医学其它专业课程,对动物疾病的诊断、预防、治疗等综合能力的培养有着重要意义,同时也是分子生物学、基因工程等现代生物技术的重要基础^[1,2]。随着动物新传染病的不断出现、多种病原混合感染日趋普遍以及畜禽疾病临床症状的非典型化趋势等新形势的出现^[3],要求我们在改善兽医微生物学与免疫学实验教学质量,提高对病原体的检测和鉴定水平的同时,还要探索适应学科发展要求、满足高素质兽医人才培养需求的研究设计型、开放式的实验教学新体系。

1 建立综合实验教学体系的目的

面对学科的快速发展和新技术的不断出现,如何在新的形势下按照新的教育思想进行改革,是我们所面临的重要问题。实验课不仅是传授知识、验证理论、培养实验技能,更重要的是锻炼和提高学生系统、综合地分析问题、解决问题的能力,培养学生的科研思维和创新精神^[4]。针对兽医学科实践性强的特点,华南农业大学兽医学院在兽医实验教学改革方面进行了有益的探索和改革,独立开设了系列实验课程,基本实现了实验教学体系从附属理论课程中剥离,在教学方式和考核方法上进行了改革,在教学实践中也取得了明显的效果。我们在承担兽医微生物学实验和兽医免疫学实验教学过程中发现,兽医免疫学实验的核心内容是对病原微生物抗原以及动物感染

收稿日期: 2013-02-20

*: 通讯作者

基金项目: 2010年度广东省高等教育教学成果培育项目[粤教高函(2011)55号]

或免疫后抗体生成的检测,而这些内容本身也是兽医微生物学诊断内容的重要组成部分,而且传统的教学模式往往验证性试验多,缺少能培养学生创新性思维的研究和设计性实验,孤立的单元知识实验多,综合性实验少^[5,6]。因此,针对原来刻板单一和条块化的教学方法,我们尝试合并两门实验课,保证实验体系的完整性和系统性,整合优化课程结构,同时,加入具有设计性的综合实验和带有研究性质的开放性实验项目,强化实验教学的过程管理,完善评估体系,以学生综合素质培养为目的,强调独立思考能力、动手能力、综合设计能力以及临床运用能力等实践技能的训练,最终构建完善的兽医微生物学与免疫学实验教学综合体系。

2 科学实验教学体系的建立

2.1 教学内容的整合优化

传统的兽医微生物学与免疫学实践教学项目是为了配合理论教学内容而安排的,设置的实验项目具有孤立性和局限性,这不利于学生创新能力及兽医临床综合应用能力的培养。从专业培养特点和实践教学改革需要,保留经典实验,删减重复、陈旧的实验,降低验证性实验的比例,将原来彼此孤立的实验进行合并调整,强化操作过程的系统训练。将教学内容整合为两大部分。第一部分

为基础实验项目(表1)。这部分实验内容强调规范性和系统性,突出微生物学的基本实验技术,将细菌抹片制备与染色技术、无菌操作技术、纯培养技术、显微观察技术以及免疫学常用诊断技术等微生物学与免疫学基本实验技术贯穿其中。我们对一些孤立性的实验项目进行了整合,例如“细菌抹片的制备、染色镜检及基本形态观察”实验涵盖了原来“显微镜的构造与使用”、“细菌的基本形态及构造的观察”、“细菌抹片的制备与染色”的内容;“细菌分离培养及移植、环境中微生物检验”则既整合了培养基制备以及细菌分离培养、移植的内容又包含了环境中微生物的检验,将细菌的分离、纯培养、接种移植、数量测定、菌落形态观察等实验技术在一次课程中系统讲述和操作。第二部分为综合性和设计性实验项目(表1),主要内容有重要病原菌的微生物学诊断和鉴定、常见动物的病原接种、抗体效价测定、免疫保护试验等。让学生从可疑的病料开始,对病原菌进行分离鉴定,同时开设病毒的分离培养与鉴定实验,包括病毒接种、分离培养等技术。此部分实验既增强学生对兽医微生物学与免疫学基本实验技术的综合运用能力,又培养了他们对实验的设计创新意识。

2.2 教学模式与方法的革新

2.2.1 整合并优化综合性、设计性实验项目 在

表 1 课程实验项目及安排

序号	实验名称	实验类型	实验要求	每组人数	学时
基本实验项目					
1	细菌抹片的制备、染色镜检及基本形态观察	基础	必做	1	4
2	细菌分离培养及移植、环境中微生物检验	基础	必做	1	4
3	细菌的生化实验、理化因素对细菌的影响 (包含药敏实验、肠杆菌科的鉴别)	基础	必做	1	4
4	直接凝集与间接凝集实验	基础	必做	1	4
5	琼脂免疫扩散实验、酶联免疫吸附(ELISA)实验	基础	必做	1	4
6	实验动物病原接种与剖检	基础	必做	1	4
7	病毒鸡胚培养、鸡胚原代细胞培养及病毒的接种	基础	必做	1	4
8	新城疫病毒的血凝及血凝抑制试验	基础	必做	1	4
综合性和设计性实验项目					
1	小鼠中巴氏杆菌的感染及分离培养、鉴定	综合	选做	5	学时不限,每位学生至少选做一个综合性与一个设计性项目,可自主选题代替设计性项目。
2	鸡大肠杆菌病的微生物学诊断(包含血清型鉴定)	综合	选做	5	
3	鸡新城疫的微生物学诊断(包含血清学诊断)	综合	选做	5	
4	小鼠中巴氏杆菌的免疫及攻毒保护实验	设计	选做	5	
5	猪口蹄疫疫苗的免疫及抗体效价测定	设计	选做	5	

学生掌握了一定的基础理论知识和实验技能后, 我们根据病原微生物的实验室诊断标准程序开设了综合性实验项目, 学生可按自己的兴趣, 从涉及重要细菌或病毒的微生物学诊断项目中至少选择一项。学生需要灵活系统地运用多种重要的微生物学操作技术, 使他们对一个完整的微生物学研究过程有更全面的认识。同时, 我们在设计性实验项目中采用探究式的教学方法。通过教师设置问题, 学生依据已掌握的实验知识, 制定实验方案, 设计实验的技术路线。实验实施前以实验小组为单位进行讨论, 教师对实验方案进行点评和改进, 最后结合实验室条件确定实验项目。学生以实验小组为单位进行实验, 自行解决实验中可能出现的问题, 自行实验总结和结果分析。这对于促使学生逐步由学习者向实践者的转化具有重要作用。在实验过程中, 教师应特别注意启发式教学方法的灵活运用, 注意培养学生独立思考、独立设计、独立操作能力, 注意实验设计思想、方法在培养学生创新精神、创新能力方面的重要作用。

2.2.2 开放式实验教学 实验教学的目标不在于教给学生的东西有多少, 而在于学生在解决实际问题中会使用的有多少。因此, 我们在保证正常的实验教学的基础上, 将实验室的场地和仪器设备全面向学生开放。通过建立一套完善的符合自身特点的实验室开放管理制度和方法, 保证实验教学资源和时间的有效开放。学生在实验课后的其它时间, 可以通过提前预约使用实验实验室的场地和仪器进行自己感兴趣的微生物学和免疫学实验操作, 如周围环境、食品、水中微生物的培养鉴定; 发病动物的病原分离以及人或动物疫苗免疫效果的验证等与现实生活相关的实验, 包括学生申请的创新实验项目、实验竞赛准备等都可实验室进行。在综合性和设计性实验项目阶段, 学生分组后可以在不同时间点使用实验室完成项目的设计、讨论和实施的整个过程, 而一些实验中的疑问也可方便地随时与实验室中或周围的老师或研究生进行交流。根本目的是鼓励学生将实验技能运用于实际, 并为学生营造良好的科研氛围。

2.2.3 优化课内、强化课外 将科学研究渗入实验教学, 按照基础性、创新性、系统性的原则, 改革

教学组织形式, 创造学生自主学习、参加课题研究的条件。依托教师的科研条件和指导力量, 在实验教学中融入科学研究的氛围, 使学生获得更广泛且深入的专业知识。培养学生发现问题、提出问题、解决问题的能力, 提高他们探究未知新知识能力, 满足其个性化发展的需要。

2.2.4 提高学生对实验的参与度 要求学生参与实验材料的准备过程, 改变以往学生只是用“对”的实验材料按预定的方法重复出了“成功”的实验结果的现状。在实验课前, 以实验小组为单位准备实验所需材料, 如培养基的配制和灭菌、菌种的复苏、样品的准备和预处理等。这个过程除了能让学生对实验有更全面的认识, 也可以让他们更加关注实验过程以及每个环节的作用。当未出现预期的结果时, 他们易于追溯整个实验过程, 找出问题所在。当一个他们全程参与的实验成功时, 所获得的成就感远远大于部分参与的实验。

2.2.5 引入案例教学 在教学过程中我们发现很多学生对于自己做的实验在实际兽医疾病诊断或防病治病中如何运用表现出了极大的兴趣。因此, 我们在综合性和设计性项目的理论教学部分增加案例教学内容。我们收集和整理兽医微生物学与免疫学教研室各位老师十几年来在帮助养殖企业或农户在兽医传染病诊断、预防和控制过程中一些典型案例的详细资料, 包括影像图片、操作流程、实验数据等。结合各个案例对涉及的实验项目讲解其作用和效果。有了这些实践运用的认识后, 学生再进行综合性与设计性实验内容就更能强化他们的实践能动性。

2.2.6 设置对照实验 大部分的学生往往只在乎最后的实验结果, 认为只要有“完美”的实验结果就是一次“完美”的实验。而很多时候, 失败的实验结果更能促使学生主动思考每个实验环节的作用和要点。从这个思路出发, 我们在一些重要实验的关键环节设计多一个中断的或有缺陷的实验对照组。如在革兰染色实验中, 每个让学生增加三个对照组: 不染色组、只染结晶紫组和脱色组。这三个对照组的设置可以让学生对革兰染色教学中“为什么细菌要进行染色”、“脱色过程在区分革兰阳性和阴性菌中的作用”两个重要问题得到具象化理解。在ELISA实验中, 可以设置不洗涤组作为对照, 让学生加深了解洗涤在降低抗体非特异结

合中的作用。通过预先设立的对照试验或让学生自己设计对照组,让他们主动地思考实验每个步骤的意义和关键点。这对于培养他们在科学实验中的实证思维有着极大地裨益。

2.2.7 利用学科优势,拓展学生相关知识 我院预防兽医学是国家重点二级学科,设有人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室、农业部兽用疫苗创制重点实验室、广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室,拥有装备良好的细菌室、细胞培养室、分子生物学实验室、实验动物房以及动物生物安全三级(ABSL)实验室。在带学生参观及操作演示的过程中,拓展他们的细菌、病毒学操作以及生物安全等相关知识。

2.3 测评体系的完善

改变以往以实验报告为主的考核方式,建立以基本实验操作为重点,结合对实验技术的综合运用与分析能力全面考量的实验测评方法。对重要的基本实验操作如培养基的配制和灭菌、细菌分离培养、细菌抹片的制备和染色、ELISA 等设为必考的实验项目(占总成绩 50%),设置不同的细菌、血清等实验材料,让学生随机抽选进行实验。从临床病例、疾病预防方法出发,设置问题,让学生综合相关实验技术进行设计和分析,并说明如何进行实验结果判定(占 20%)。规范实验报告的撰写,注重实验数据的记录与展示(图片、表格等),特别强调分析讨论部分的独立思考和延伸性(占 20%)。同时,还要关注学生平时实验中的主动性、动手操作能力等(占 10%)。由于实验课考核的目的根本上还是为了提高学生的操作能力,所以对必考项目,我们允许给学生一次补考的机会。那些对自己表现不满意的同学,可以给他们机会练习后再进行补考。

3 实验教学支撑体系的构建

3.1 建设实验教材

我们根据自身的教学实际自编教材,在原则上与理论教材保持一致的前提下,对实验内容进行合理删减和整合,注重实验内容的连续性和完整性,尽量符合临床检验实际和科学研究的实际程序,突出对学生独立的工作能力的训练。在坚持教学大纲和使用全国统编教材的前提下,不断更新和充实教学内容,并结合教师本身科研实践和相关学科的发展动态,向学生传授最新的专业知识和技术方法。

3.2 实验室硬件建设

我院历来重视实验教学工作,在政府、学校

对实验教学经费的不断投入下,已建成 150 多平米的本科多媒体教学实验室和一个准备室,并有兽医微生物学与免疫学教研室的三个研究实验室和动物房作为辅助。现已拥有荧光显微镜、酶标仪、PCR 仪、超低温冰箱等多种进口仪器设备,完全能够满足学生开展设计性实验及开放课题的要求。

3.3 建设“双师型”实验教学队伍

为了培养既能从事理论教学,也能从事实践教学;既能科研,又能从事专业技术工作的教师队伍,根据教师的年龄、学历、经历制定出具体的培训计划。一方面鼓励教师参与各种类型的生产实践、横向课题项目的研究,另一方面定期组织一些青年教师到实习基地或生产企业锻炼,通过产学研的结合来提高教师实践开发能力和创新能力。

4 结语

我们将 2010 级动物医学专业的一个班作为综合实验教学体系的试点班,通过综合设计性的项目和开放式的实验教学,试点班的学生在实验兴趣、科研热情、动手操作能力和综合运用能力都比普通班有了明显的提高。其中部分学生参加并获得了 2012 年全国大学生“生泰尔杯”动物医学专业技能大赛特等奖,尤其在病原菌检查的竞赛环节取得突出的成绩。随着兽医微生物学学科的发展以及社会对人才需求标准的提高,我们的实验教学改革还有待进一步完善和深化。同时在我们正进行的教学改革实践中仍有许多问题,如综合性、设计性实验项目的选取和优化,开放实验室的规范化管理等,需要进一步探讨和解决。我们将在实验教学的不断实践中进行改革和探索,培养出更多具有实践能力和创新精神的兽医专业人才。

参考文献:

- [1] 陆承平,方维焕,陈金顶,等.兽医微生物学学科发展[J].中国家禽,2008,30(9):31-34.
- [2] 杨汉春,焦新安,周继勇.兽医免疫学学科发展[J].中国家禽,2008,30(9):26-31.
- [3] 庞歌,陈继红,朱金凤.兽医微生物学实验教学改革与实践[J].河南农业,2011(2):28-29.
- [4] 乔薪瑗,李一经.兽医微生物学实验教学改革探索[J].黑龙江畜牧兽医,2010(11):166-167.
- [5] 田丽红,肖向红.兽医微生物学实验教学体系的构建[J].价值工程,2010(35):258-259.
- [6] 倪宏波,王春仁,吴凌,等.兽医微生物学综合设计性实验教学初探[J].黑龙江畜牧兽医,2011(13):182-183.

当前我国生猪产业现状及后期走势判断

王明富

(国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005)

摘要: 进入2013年, 全国生猪市场迎来开门红, 蛇年春节前多地生猪价格直逼18元/kg。全国猪价在第三周达顶点后, 于第四周开始跌潮并席卷全国, 猪价下跌之快令养殖户措手不及。春节需求旺季过后, 随着终端消费需求的萎缩, 供求关系的变化, 猪价肉价均呈下行趋势, 至3月下旬全国一半以上地区猪价已经跌破13元/kg。而饲料价格继续小幅上涨, 从而导致猪粮比价跌至5.45:1, 养猪亏损程度进一步扩大。而此次拐点出现后的目标位可能将是跌破成本线, 进入亏损区, 在二季度探底, 三季度起价格有望反弹。

关键词: 生猪; 养殖; 价格; 趋势

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0048-03

进入2013年, 全国生猪市场迎来开门红, 蛇年春节前多地生猪价格直逼18元/kg。不过, 春节需求旺季过后, 随着终端消费需求的萎缩, 供求关系的变化, 猪价肉价均呈下行趋势。3月初大型养猪户仅有稍许盈利, 而散户则处于保本边缘。

1 一季度国内生猪市场情况

元月上半月, 全国生猪市场表现格外抢眼。猪价在元旦后突然发力, 半个月, 猪价上涨幅度高达每公斤2元多, 全国猪价至1月中旬时高达17.7元/kg, 其中:广东、河北、山东、四川等地毛猪均价突破18元/kg的大关, 而福建和广东局部地区猪价一度飙升至18.8元/kg。猪价涨幅明显超出预期, 部分养殖户惜售心理增强, 养殖户普遍押栏, 这也为下半月猪价的快速下跌埋下伏笔。全国猪价在第三周达顶点后, 于第四周开始跌潮席卷全国, 猪价下跌之快令养殖户措手不及。到元月底, 全国生猪均价已回落至16.47元/kg, 二周内跌幅高达7.35%。其中:东北三省及山西等地再次重回16元/kg以下。进入2月份以后, 生猪行情震荡下跌, 至3月下旬全国一半以上地区猪价已经跌破13元/kg。而饲料价格继续小幅上涨, 从而导致猪粮比价跌至5.45:1, 养猪亏损程度进一步扩大, 每头亏损已突破100元。

1.1 猪价跌两成肉价仍坚挺

价格监测资料显示:和2012年一样, 直接影

响CPI的猪肉零售价与生猪出栏价的联动性并不一致。肉价随着猪价下调的同时, 猪肉零售价格依然坚挺。2013年以来, 全国生猪出栏价已由高峰时的17.42元/kg跌至3月30日的12.69元/kg, 跌幅已经超过了27%, 猪价已基本跌回到2010年9月底的水平。与此同时, 全国猪肉零售价格由高峰时的25.32元/kg下降至3月30日的21.23元/kg, 降幅约为16%。和生猪价格相比, 猪肉零售价格反应明显滞后。见图1。

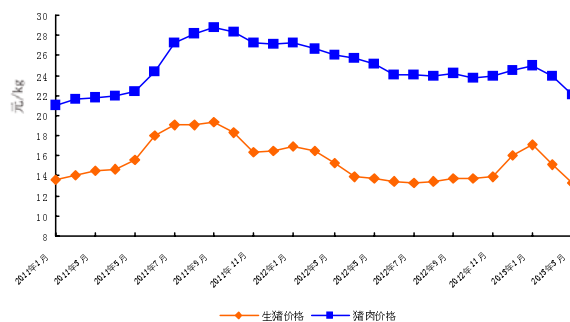


图1 2011年以来全国生猪、猪肉价格走势

1.2 猪粮比价跌破调控生猪市场预案中的盈亏平衡点, 进入“黄色区域”

猪价的大幅下跌, 加上饲料价格的高企, 使得养殖盈利急剧缩减, 猪粮比已经跌破盈亏平衡线6:1, 步入介于“(5:1~5.5):1”之间的中度亏损时代。3月30日猪粮比价已跌至5.45:1, 同比下跌

0.91 个百分点, 已低于调控生猪市场预案中的盈亏平衡点。根据国家发改委出台的《防止生猪价格过度下跌调控预案(暂行)》规定, 当猪粮比价在(6:1~5.5):1 之间, 表明生猪价格出现轻度下跌, 处于“蓝色区域”, 生猪生产效益下降, 政府要适度采取措施。根据发改委发布的《防止生猪价格过度下跌调控预案(暂行)》规定, 当猪粮比持续一段时间处于 6:1~5.5:1 的蓝色预警区域时, 政府将适时增加一定数量的冻猪肉储备; 如果跌破 5.5:1 进入黄色区域, 将进一步加大收储力度, 如果进入 5:1 以下的深度亏损区域, 养殖户将获得母猪补贴。据了解, 本轮冻猪肉收储一旦展开, 将对支撑猪肉价格、提振市场信心起到积极作用。见图 2。

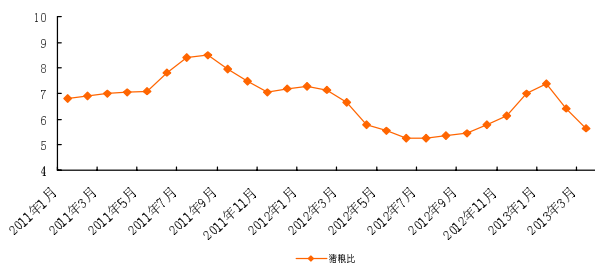


图 2 2011 年以来全国猪粮比走势图

1.3 生猪存栏虽略有减少, 但能繁母猪仍居历史较高水平

2011 年下半年生猪价格增长较快, 养猪户大都赚了一笔钱, 这也吸引了不少养殖户从 2011 年 11 月至 12 月开始大规模养殖, 加之猪病形势较为平稳, 成活率较高, 造成 2012 年生猪市场供应量持续增加。根据国家统计局数据显示, 2012 年年底生猪存栏 47 492 万头, 同比增长 1.6%。2013 年 3 月 18 日, 农业部公布了 2013 年 2 月份 4 000 个监测点生猪存栏信息, 2 月份生猪存栏较上月减少 1.9%, 其中能繁母猪存栏较上月减少 0.2%。能繁母猪存栏水平较高的现状仍将令国内生猪价格上行受压。见图 3、图 4。

2 猪价急剧下跌原因分析

春节临近、消费高峰将至, 猪价缘何不涨反跌? 生猪集中出栏应该说是主要原因。

2.1 春节期间储备肉大面积投放引发连锁效应

春节期间, 部分地区为了稳定物价, 相继投放储备肉, 加之新闻媒体宣传储备肉投放导致肉价企稳回调, 市场悲观情绪渐重引发连锁效应, 养猪

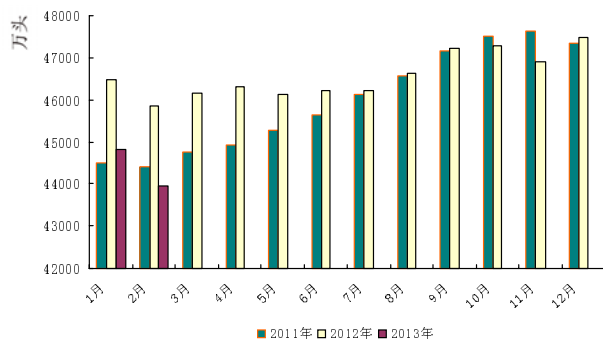


图 3 2011 年以来各月全国生猪存栏数比较

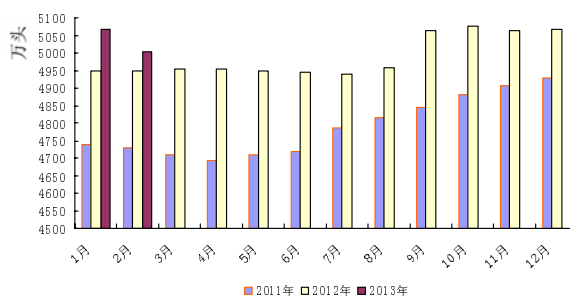


图 4 2011 年以来各月全国能繁母猪存栏数比较

户恐慌出栏, 猪价想涨也难。

2.2 养殖户卖跌不卖涨, 生猪集中出栏

全国猪价在元月第三周达顶点后, 于第四周开始跌潮并席卷全国, 节前猪价快速下跌令养殖户始料不及, 养殖户惜售心理减弱, 生猪集中出栏; 春节长假后, 猪肉同其他消费品一样, 进入消费淡季, 猪价跌速超出心理预期, 养殖户恐慌心理加剧, 出现集中抛售。

2.3 猪市行情呈现弱势, 大猪上市多, 收购方压价

猪价急跌大大打击了养殖户的养殖积极性, 养殖户压栏心理减弱, 部分地区浮现抛售现象, 加之节后上市肉猪体重较大, 大多体重在 120 kg 以上, 且出栏时让猪都吃饱喝足, 出肉率下降, 屠宰场或收购方实行压价策略。

2.4 农产品比价变动影响

近期蛋、鱼、菜上市量增加, 价格普遍下跌, 猪价跟跌。

3 生猪业扶持力度增强 短期内政策效应难现

春节期间, 财政部及国税总局相继发布公告, 分别从保险及增值税方面增强了对生猪业的扶持力度, 为养殖企业及养殖户带来利好消息。

3.1 降低养猪风险, 提高育肥猪保险补贴比例

自 2013 年起, 在地方财政至少补贴 30% 的基

基础上,中央财政育肥猪保险保费补贴比例由 10% 提高至中西部地区 50%、东部地区 40%。本则通知的下发,意味着国内生猪养殖企业及养殖户只需承担 20%~30% 的保费即能保障养猪带来的风险。

3.2 “公司+农户”模式销售畜禽免增值税

自 2013 年 4 月 1 日起,“公司+农户”经营模式销售畜禽将免去增值税。据了解,“公司+农户”经营模式已经被普遍采用,即公司与农户签订委托养殖合同,向农户提供畜禽苗、饲料、兽药及疫苗等,农户饲养畜禽苗至成品后交付公司回收,公司将回收的成品畜禽用于销售。该政策的影响虽不及外界想象的那么大,但明确了国家对养殖业的支持。

3.3 国家加强对美国猪肉进口的监测,或将减少猪肉的进口量

中国要求自 3 月 1 日起由第三方确认进口美国猪肉不含瘦肉精。美国是我国猪肉的进口大国,海关数据显示,2012 年我国进口美国猪肉量占总进口量的 57.58%,高达 22.13 万吨。加强对美国猪肉进口的监测,或将减少猪肉的进口量,这对国内猪市来说无疑是个利好的消息。

虽然国家在政策层面上对生猪养殖业扶持力度已增强,长远来看,对猪市形成利好支撑,但就目前情况来看,国内猪市供应远远超出需求,即使是利好政策频繁出台,也难在较短的时间内起到相应的作用,因此对目前正处于下行周期的猪市而言支撑力度有限。第 9 周已经是猪粮比价跌破 6:1 盈亏均衡线的第 2 周,在随后两周内而且有可能跌破 5.5:1 的中度亏损线,进入“黄色预警区域”。生猪市场的不景气,使得饲养户补栏意愿受阻,目前大部分饲养户持观望态度。每一时期的猪价都是其构成因素各方博弈的结果,而其供求关系,生猪数量又起决定性的作用。今年的下跌主要动力却是来自于供应水平的增加。政府调控猪市的原则不是改变市场周期,其关键点是掌握好调控时机和度,减少进口这一措施已经开始,启动收储和发放母猪补贴的措施也会随猪粮比价的进一步下跌而实施。

4 猪价震荡向上的总体态势或难改变

根据历史周期推算,预计 2013 年的二季度猪价将震荡回落探底,但估计不会出现 2010 年上半年深度下跌局面,波动幅度也将远小于 2011 年。

从各个层面分析,悲观预测 2013 年生猪全年均价在 14.5 元/kg 以上,不会低于 2012 年。生猪养殖行业总体仍处微利状态。考虑到大型规模养殖企业当前正处于加速扩张期,未来 2~3 年将保持 50% 以上的扩张速度,预计 2013 年四个季度大型生猪养殖企业的盈利增速将是逐季上升的走势。2013 年猪价走势究竟如何还要看供求关系和生猪疫病防治,但生猪价格总体走势为震荡向上的态势或难改变。

5 建立和完善生猪产销平稳发展长效机制

尽管供求因素影响到猪肉价格,归根结底,生产规模化程度不高、信息严重不对称等因素是造成近几年来猪肉价格大涨后又大跌周期波动的主要原因。目前我国养猪业是一个充满竞争的行业,同时也是一个非常特殊的行业。受生活习惯的影响,我国大多数居民有消费猪肉的习惯,决定了其是一个不可消失的行业;同时,它不像其它产业一样说停产就停产,养猪是赔钱也得养下去;养猪业的分散性决定了不能形成垄断效应;养猪业的主体仍是农民,农民是弱势群体;因此,生猪养殖过程不能完全市场化。生猪养殖政策应从生产、市场两方面建立和完善产销平稳发展的长效机制,避免生猪价格的大起大落。一是构建稳定的持续的财政保障支持体系。国家和各级地方政府,要遵循市场经济规律,利用市场功能调节余缺,补贴和扶持政策应保持连续性,明确各方投资主体对生猪的养殖预期。二是建立和完善稳定生猪生产和流通的长效机制,转变“重生产、轻流通”的观念。三是推动生猪期货上市,实行透明市场化,化解价格“非理性”波动。生猪期货作为一种金融手段,是实现农户和企业规模化、专业化生产的好办法,能帮助养殖户、屠宰厂、加工企业有效规避价格波动风险,锁定预期利润;更可以吸引更多各层次的投资者积极入市参与交易,活跃期货市场。从而为增强我国在国际生猪贸易中的“话语权”,甚至能为形成全球生猪定价中心提供推动力。期货市场可以确保价格透明,最终保护养殖者的利益,使养殖户“先卖后养”锁定收益,同时也增加了国家宏观调控的一个重要渠道,避免“猪贱伤农”、“肉贵伤民”、“贵贱扰国”的猪周期出现。

兽用生物制品实验动物福利初探

盘伟岚, 黄丽萍, 陈佐彬

(肇庆大华农生物药品有限公司, 广东 肇庆 526238)

摘要: 兽用生物制品实验动物的福利越来越受到人们的关注和重视, 本文就兽用生物制品动物实验过程中的有关动物福利进行探讨。

关键词: 实验动物; 动物福利; 动物实验

中图分类号: S859.79.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)02-0051-02

评价兽用生物制品的质量, 往往采用动物实验, 实验动物的质量影响动物实验结果的科学性和可靠性。随着科技的发展, 实验动物的质量问题引起人们对动物福利的关注和重视。本文就兽用生物制品动物实验过程中的动物福利进行探讨。

1 饲养实验动物中的福利

1.1 对建筑设施的要求

1.1.1 选址 实验动物房应选在环境空气质量及自然环境条件较好的区域, 应远离铁路、码头、飞机场、交通要道以及散发大量粉尘和有害气体的工厂、堆场等有严重空气污染、振动或噪声干扰的区域。尽量减少外界环境对实验动物的伤害, 让实验动物住得舒适。

1.1.2 建筑的设施要求 兽用生物制品的实验动物房的建筑设施一定要符合兽用 GMP 的验收标准, 考虑饲养环境中最重要的因素: 温度、湿度、换气次数、空气洁净度、压强梯度、菌落数等。这些因素直接影响着实验动物的新陈代谢、健康状况、精神状态, 影响实验动物的质量, 让实验动物在良好的环境生活, 才能保证动物实验结果的科学性和可靠性。

1.2 对饲养设备的要求

兽用生物制品的实验动物大多数是 SPF 级的实验动物, 屏障级的隔离器、IVC 系统(鼠笼)等的设计不但要满足饲养的基本要求, 还要全面考虑并不断完善, 如增加符合实验动物的生活习惯的设备, 提供音乐, 增设造型模拟野外环境, 提供玩具等。

1.3 对饲养管理的要求

1.3.1 对饲养人员的要求 饲养人员应参加省级的实验动物技术培训, 并取得“实验动物从业人员培训考核合格证”才能上岗。饲养人员经过了专

业的培训, 才能遵守实验动物饲养管理的各项操作规程, 并在道义、情感和实践中尊重善待爱惜实验动物, 在“人”的因素上切实落实动物福利^[1]。

1.3.2 对卫生的要求 在饲养实验动物的过程中, 每天的卫生、消毒必不可少, 保证实验动物环境的清洁, 才能确保兽用生物制品的实验动物的洁净级别, 保证实验动物的质量。

1.3.3 对饲养密度的要求 饲养的密度过高会导致拥挤踩踏、抢食、打架、饲养环境空气质量下降等, 直接影响到实验动物的健康状况^[2]。合理的饲养密度能让实验动物在生理和心理上的需要得到更好的满足, 实验动物的状态也会更好, 动物实验也能顺利地进行。

1.3.4 对饮水和饲料的要求 兽用生物制品的实验动物饮用水除了 pH 值、酸碱度、重金属等指标达到合格外, 还要求是无菌的、高标准的饮用水, 保障了实验动物的身体健康, 使实验动物避免受到微生物、化学物质的伤害。

根据不同的实验动物种类、生理功能、生产性能、体重、年龄、性别等, 制定每天每头动物所需的饲料量, 确保有足够的饲料满足动物的生理和生产的需要。为保证实验动物饲料的质量, 要定期对其营养成分含量进行检测。营养全面、安全、卫生、适口、量足的饲料, 可以保证实验动物免受饥饿, 其各方面生理条件才会达到最佳状态, 实验结果才能真实反映。

1.3.5 对垫料的要求 垫料是实验动物最直接的生活环境, 对兽用生物制品的实验动物除了要求吸湿性强、保温性好、无灰尘、无污染、无芳香烃类气味、无变质、无霉变, 还要求是无菌的(无微生

物和寄生虫),并检验合格后才能使用。

2 动物实验中的动物福利

2.1 对实验方案的要求

对实验方案进行审核:(1)根据“3R”原则,实验动物模型的替代、动物的数量的减少和实验方案的优化;(2)实验动物在实验过程中有没有疼痛;(3)实验结束后,实验动物是否有进行安乐死。认真地审核实验的方案,才能提前对实验动物福利进行监督,防患于未然,才能避免实验动物的浪费,减轻动物的痛苦^[3]。

2.2 对实验动物的质量要求

根据“实验动物管理条例”,购买的实验动物必须有质量合格证,在实验前根据质量合格证开具动物实验证明。实验动物监测机构及时有效地监督和管理实验动物的使用情况,确保实验动物的质量,避免实验动物的浪费。

2.3 对实验人员的要求

实验人员必须经过公司组织的有关实验动物的培训,应熟悉实验动物的生理、生态、习性,本着善待动物、爱护动物的理念来进行动物实验,才能减少实验动物的疼痛和恐惧。

2.4 对动物实验操作的要求

兽用生物制品的动物实验是以注射疫苗和采血检测为主,实验时间短,大约 1 分钟,如果麻醉的话,反而增加了麻醉风险,所以要求实验人员练好基本功。进行实验时动作要慢、温和地抓取和固定实验动物,与实验动物交流,轻轻地抚摸。不要粗暴对待实验动物,更不能虐待动物。注射疫苗和采血的注射器一定要减少创伤,尽量选择小号针头,注

射和抽血动作要快速、准确,注射和采血结束后要按几分钟,减低出血的几率,减轻实验动物的疼痛。

2.5 对实验后护理要求

实验动物在实验后还要忍受实验给它带来的疼痛的折磨。要求我们饲养人员和兽医要有爱心,细心地观察实验动物的反应,出现问题要及时处理。

2.6 对实验结束后实验动物的处置要求

实验结束后,要采用安乐死术,减少实验动物死亡前的痛苦。二氧化碳法是现在常用的安乐死方法,使实验动物直接缺氧,在动作(肌肉活动)消失前意识丧失,从而无痛苦死亡^[4]。同时根据兽用生物制品 GMP 的要求,所有的实验动物尸体和废弃物都要高压灭菌之后,送到有资质的医疗卫生废弃物处理站进行无害化处理。

综上所述,实验动物福利贯穿兽用生物制品动物实验的整个过程,关爱实验动物、重视动物福利,是每个实验人员的职责。我们要不断地完善实验动物福利设施,提高实验动物管理水平,深入理解实验动物福利的精髓。

参考文献:

- [1] 潘雅敏. 浅谈落实实验动物福利的几点对策[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2011, 41 (4) :56.
- [2] 赵海忠, 熊忠良, 汪宏才, 等. 日常工作中实验动物福利的基本要求[J]. 湖北畜牧兽医杂志, 2011 (2) :10-11.
- [3] 黄振兴, 李宏霞. 药物安全性评价中的实验动物福利[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19 (7) :68-70.
- [4] 张潇, 谭德讲, 李保文, 等. 二氧化碳安乐死在实验动物中的应用与最新发展[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19 (8) :81-84.

《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、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

订 价:每期定价 5.5 元,全年 33.00 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。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:广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编:510500)

电 话:020-37245052、37288167 E-mail:gdxymsy@163.com、gdxymsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告