

双月刊 1976年3月创刊

第37卷第6期 (总第166期)

2012年12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 黄小建 陈小云 郑庆祿

李 岩 林旭堃 陈瑞爱

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

·专题综述·

- 酶联免疫吸附试验在几种犬源人兽共患病检测中的应用..... 贾春玲, 吕殿红, 等(1)
- CTX-M型超广谱β-内酰胺酶研究进展..... 冯建昆, 吕婧玉, 等(4)
- 家畜繁殖性状基因LHβ的研究进展..... 李 杰, 张金波, 等(7)
- 犬传染性气管支气管炎相关的呼吸道病毒研究概况..... 翁善钢, 陆明辉, 等(10)

·畜牧技术·

- 乐昌市梅花猪保种繁育与推广建设..... 黎小芬, 黄智明, 等(15)
- 当前我国生猪价格波动情况及后期走势判断..... 虞 华, 虞丽娜(18)

·兽医临床·

- 东莞市屠宰场待宰生猪口蹄疫抗体水平的检测与分析..... 李小军, 罗卫强, 等(19)
- 水禽禽流感免疫防控关键技术与措施..... 陈建红, 刘佑明, 等(23)
- 几例慢性仔猪副伤寒的病理观察..... 聂立欣, 于 博(27)

·试验研究·

- 免疫抗体压力下PRRSV GD株Nsp2和GP5基因变异分析..... 牛晓芸, 李康宁, 等(29)
- 猪高致病性蓝耳病毒活疫苗免疫试验..... 冯开容, 钱慧慧, 等(32)
- 乳酸锌对蛋鸡生产性能及蛋壳质量的影响试验..... 赵必迁, 周安国, 等(35)
- 芪芍增免疫对鸡法氏囊病疫苗免疫增强作用的研究..... 刘建伟, 郭 莉, 等(38)

·华南宠物园地·

- 一例猫淋巴瘤的临床诊治..... 陈义洲, 黄婉婷, 等(42)
- 豹纹守宫的人工饲养与繁殖..... 胡 琳, 李思瑶, 等(47)
- 一例犬落叶天疱疮的诊治..... 李开江, 田 野, 等(51)

·信息之窗·

- 2012“永顺杯”优秀论文评选启事..... (26)
- 欢迎订阅本刊..... (28)
- 2012年(总第161-166期)目次..... (53)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Dec.2012 Volume 37,Number 6 (Total No.166)

Main Content

- The applications of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of several zoonoses from dogs*
.....Jia Chunling, Lv Dianhong, et al(1)
- Research Progress in CTX-M-type Extended-Spectrum Beta-Lactamases* ••Feng Jiankun, Lv Jingyu, et al(4)
- Research advances in Lh β gene controlling the reproductive traits in livestock* •••Li Jie, Zhang Jinbo, et al(7)
- A Review on Canine Respiratory viruses research* •••••Weng Shangang, Lu Minghui, et al(10)
- Conservation, Breeding and Extension of Meihua Pig in Lechang* •••••Li Xiaofen, Huang Zhiming, et al(15)
- Current fluctuations on pig prices and the later trend in China* •••••Yu Hua, Yu Lina(18)
- The detection and analysis on the levels of FMD antibody in the pigs to be slaughtered in the slaughterhouse of Dongguan city* ••••• Li Xiaojun, Luo Weiqiang, et al (19)
- The Key Technology and Measures on the Vaccination for Prevention and Control of Waterfowl Avian Flu*••
.....Chen Jianhong, Liu Youming, et al(23)
- Pathological observation of several cases of chronic piglet paratyphoid* •••••Nie Lixin, Yu Bo(27)
- Variation Analysis of the Nsp2 and GP5 Gene of PRRSV (GD strain) under Antibody Selective Pressures*••
..... Niu Xiaoyun, Li Kangning, et al(29)
- The Vaccination Results of Attenuated Live Vaccine of Highly Pathogenic PRRS*•••••
.....Feng Kairong, Qian Huihui, et al (32)
- Effects of Zinc Lactate on the Production Performance and Eggshell Quality in Laying Hens* •••••
.....Zhang Biqian, Zhou Anguo, et al (35)
- Effect of Qishaozengmiansan on the Immunological Enhancement of IBD Vaccine in Chickens*•••••
.....Liu Jianwei, Guo Li, et al(38)
- Clinical diagnosis and treatment of feline Lymphosarcoma*•••••Chen Yizhou, Huang Wanting, et al(42)
- The artificial feeding and reproduction of the Lopard Gecko*•••••Hu Lin, Li Xiyao, et al(47)
- Diagnosis and therapy of one case of canine pemphigus foliaceus* •••••Li Kaijiang, Tian Ye, et al(51)

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

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

Chief Editor: JIANG Zong-yong

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 gdxmsy@163.com

酶联免疫吸附试验在几种犬源人兽共患病检测中的应用

贾春玲, 吕殿红, 林立峰, 温肖会, 袁洁, 魏文康*

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 随着宠物养殖量的增加, 宠物疫病也越来越受到人们的关注。宠物源性人兽共患病不仅危害宠物养殖业的健康发展, 而且严重危害了人类健康甚至于生命安全。早期诊断对有效预防和控制宠物源性人畜共患病有重要意义。酶联免疫吸附试验具有操作简单、快速、敏感性高、特异性强等优点, 在宠物疫病检测中发挥的作用越来越大。本文对酶联免疫吸附试验在犬源性人兽共患病中的狂犬病、弓形虫病、布鲁氏菌病和钩端螺旋体病检测上的应用与研究进展进行综述, 旨在促进该技术在宠物疾病检测方面的应用与推广。

关键词: 犬源性人兽共患病; 酶联免疫吸附试验; 应用; 进展

中图分类号: S855.99

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0001-03

随着人民生活水平的提高、人口老龄化的出现, 家养宠物, 特别是犬的养殖量越来越多; 由于宠物与人的接触, 导致人兽共患病的发生也越来越多。常见的犬源性人兽共患病有狂犬病、弓形虫病、布鲁氏菌病、钩端螺旋体病等, 这几种病均为高度接触性的烈性传染病, 除给宠物主带来一定经济损失外, 还严重威胁着宠物和人类的身体健康, 甚至于生命安全。加强这些疫病的早期诊断和抗体检测, 对于预防和控制疫情的发生、保障人民生命和财产安全具有重大意义。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)具有操作简单、用途广、敏感高, 可定性、定量等优点, 广泛应用于科研和各项检测工作中, 在犬源性人兽共患病的检测中将发挥重要的作用。现将ELISA原理、分类及其应用等介绍如下:

1 ELISA的原理和分类

1971年瑞典学者 Engvall 和 Perlmann, 荷兰学者 Van Weeman 和 Schuurs 分别报道将免疫技术发展为检测液体中微量物质的固相免疫测定方法, 称为酶联免疫吸附试验。ELISA的基本原理是将某种特定抗原或抗体吸附于固相载体表面上(包被), 包被后的抗原或抗体可保持其生物学特性和免疫学活性, 再用酶标记抗原或抗体, 保留其免疫学活性, 同时又具有酶的活性。在测定时, 受检标本(测定其中的抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体发生免疫反应, 洗涤后, 在固相载体上形成抗原抗体复合物, 再加入酶标记的抗原或

抗体, 通过特异反应结合在固相载体上, 这时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈比例, 加入酶反应底物后, 底物被酶催化成为有色产物, 颜色反应的深浅与抗原(或抗体)的含量成一定比例, 用酶标仪在适当的波长读取吸光度值, 计算出相应抗原或抗体含量。由于酶催化效率高, 间接放大了免疫检测结果, 使敏感度提高。常用的ELISA测定法有: 双抗体夹心法测抗原、双抗原夹心法测抗体、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原、捕获包被法测抗体等多种方法。

2 酶联免疫技术在几种犬源性人兽共患病检测中的应用及研究进展

2.1 ELISA在犬狂犬病检测中的应用

狂犬病(Rabies)是由狂犬病病毒(rabies virus)引起的人兽共患疾病, 人和其他所有温血动物对狂犬病毒都易感。该病广泛分布于全世界, 是一种自然疫源性疾病。近年来, 我国狂犬病疫情一直呈上升趋势, 导致的人员死亡数居我国法定报告传染病首位。

2.1.1 ELISA方法检测犬狂犬病病毒 Perrin P于1986年建立ELISA方法, 其敏感性及特异性与荧光抗体方法(FAT)有很好的相关性(96%), 灵敏度略低于FAT^[1]。通过获取狂犬病病毒特异性多克隆抗体, 运用ELISA技术检测脑组织中的狂犬病病毒核蛋白。可检测血清1型(PV株)、血清3型(Mokola株)和欧洲蝙蝠狂犬病毒血清1型(PV株)。

由张国强等^[2]建立的狂犬病病毒抗原的定量

检测方法,采用狂犬病病毒 aG 株免疫豚鼠,制备抗狂犬病病毒多克隆抗体,纯化后以辣根过氧化物酶进行标记,建立双抗体夹心 ELISA 法检测系统,针对疫苗生产过程中的病毒含量进行监测。用该方法对狂犬病疫苗进行抗原定量,检测市售不同毒株和细胞系生产的狂犬病疫苗,其结果在 2.4~9.9 IU/mL 之间,与 NIH 法测定的疫苗效力具有一定的相关性。该方法可对来自不同毒株和不同细胞系的狂犬病疫苗进行快速定量检测,为疫苗生产中的质量控制提供了简便的监测手段。

2.1.2 ELISA 方法检测犬狂犬病抗体 国内外都有利用 ELISA 技术生产的犬狂犬病抗体检测试剂盒。赖红青等^[3]运用购自法国 SYMBIOTICS 公司的狂犬病抗体检测 ELISA 试剂盒对 40 份采自东莞市望牛墩镇已免疫狂犬病疫苗至少 30 d 以上的犬只进行抗体监测,试验结果表明:狂犬病抗体阳性率达 92.5%,免疫效果满意。孙招金等^[4]将 40 只犬免疫兽用狂犬病疫苗,并在免疫后 14 d 静脉采血分离血清,分别采用 ELISA 法和细胞培养病毒中和试验 (FAVN) 法 (OIE 指定方法) 检测血清样品中抗体效价并进行结果比较。实验表明:两种方法检测结果差异不显著 ($P>0.05$)。由此可见运用 ELISA 方法检测犬狂犬病抗体灵敏度高、特异性强、操作简单,避免了 FAVN 检测中因接触狂犬病活毒带来的安全隐患,因而值得推广运用。

2.2 ELISA 在犬弓形虫病检测中的应用

弓形虫病 (Toxoplasmosis) 是由刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 所引起的人畜共患病。由于它感染人类特别是孕妇后,病原可通过胎盘感染胎儿,直接影响胎儿发育;致畸作用较未感染孕妇大 10 倍,影响优生,成为人类先天性感染中最严重的疾病之一,所以备受人类医学工作者重视。猫科动物是弓形虫的终末宿主,人类和犬科动物只是弓形虫的中间宿主,因此,对犬和猫进行弓形虫的研究都很重要。弓形虫病的临床症状较为复杂,其症状和体征又缺乏特异性,易造成误诊。目前对该病的诊断主要依据血清学和病原学方法。

ELISA 方法可检查弓形体 IgM 与 IgG 抗体,并有灵敏度高、特异性强等优点,也可用于抗原鉴

定。于咏兰等^[5]应用 ELISA 法和乳胶凝集试验对北京地区犬猫进行粪地弓形虫抗体检测,结果在 66 只犬猫的血清中,ELISA 方法检测的阳性率为 24.0%,乳胶凝集试验阳性率为 21%。郑红星^[6]等对兰州地区 66 份犬血清进行弓形虫抗体的检测,运用 ELISA 方法共测得阳性血清 16 份 (占 24.0%),而采用间接血凝试验测得阳性血清 14 份 (占 21.0%)。上述结果表明,与乳胶凝集和间接血凝相比,ELISA 方法更为灵敏,特异性更强。

2.3 ELISA 在犬布鲁氏菌病检测中的应用

布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌引起的人畜共患病,在我国被列为二类法定传染病。犬布鲁氏菌病是犬感染布鲁氏菌引起的一种人畜共患传染病。犬感染本病后,多数呈隐性感染,少数可表现出临床症状,表现为生殖器官和胎膜发生炎症,引起流产、不育以及多种部位出现局部病灶。但是带菌犬可以通过消化道、呼吸道和皮肤三种途径感染人。病人表现为波状热、多汗、头痛、失眠、恶心和呕吐、关节炎、睾丸炎、神经痛、四肢皮疹、淋巴结肿大、肝脾肿大和流产。据报道,犬布鲁氏菌病在全球多个国家和地区都有发生,我国多个省份存在犬布鲁氏菌病,而且发病数量逐年上升,由犬布鲁氏菌感染人的病例报道也日益增多。犬布鲁氏菌病的控制和根除对人类健康和公共卫生安全具有重要的意义。

病原 (细菌) 分离适用于该病的确诊,但是耗时长又容易出现污染;虎红平板凝集 (RBPT) 虽然操作比较简单,但是其特异性较低,易出现假阳性,而且判定主观性较强,不易量化;试管凝集试验 (SAT) 是我国法定的诊断布鲁氏菌病的方法,SAT 的准确性较高,但该方法繁琐费时,不适于现场操作。

上述 3 种技术诊断抗原均直接采用布鲁氏菌菌体本身或培养物、提取物,生产与制备过程涉及活菌培养,存在一定的风险,必须采取严格的生物安全措施,大大提高了生产制备成本^[7-9]。ELISA 快速诊断方法的建立仍是研究的热点和方向,其优点在于敏感性和特异性高。OMP3 为布鲁氏菌外膜蛋白,在感染牛、绵羊、山羊、犬和人类均为优势免疫原,且在抗原性上具有较好的布鲁氏菌种属特异性^[9]。赵焜等^[10-11]于 2009 年克隆了犬布鲁氏菌外膜蛋白 OMP31 基因并构建原核表达系统,对表达产物进行了初步的血清学鉴定。以大肠杆菌表达

OMP31 重组蛋白为包被抗原,初步建立了检测血清特异抗体的间接 ELISA 方法。该方法有很好的特异性和重复性。该方法的建立为犬布鲁氏菌病诊断提供了一种比较实用的血清学检测方法。

2.4 ELISA 在犬钩端螺旋体病检测中的应用

钩端螺旋体病 (Leptospirosis) 是一种重要而复杂的人兽共患病和自然疫源性传染病。犬钩端螺旋体病是由犬钩端螺旋体或出血性黄疸钩端螺旋体引起的。人类感染是通过直接接触病犬排出的钩端螺旋体所致。临床以早期钩端螺旋体败血症,中期的各器官损害和功能障碍,以及后期的各种变态反应后发症为特点。重症患者可发生肝肾肾功能衰竭和肺弥漫性出血,常危及生命。

传统的检测方法是显微镜暗视野直接检查菌体或用显微凝集试验,虽然能对感染的实验动物做出明确的诊断,但需接触活的菌体或菌株,存在生物安全隐患,结果判定客观性不强,不易标准化,而且不宜区分感染抗体和疫苗抗体。在国外加拿大学者成功研究了快速检测犬钩端螺旋体的新方法——间接 ELISA。该法与显微凝集试验比较具有易标准化,诊断制剂能在常规条件下大量制备的特点^[12]。Hartman 等研究出测定犬抗钩端螺旋体 IgG 和 IgM 的酶联免疫吸附试验法,当犬呈急性钩端螺旋体病时,IgM 抗体滴度高,IgG 低;有过免疫或有钩端螺旋体病史的犬 IgG 滴度高,而 IgM 滴度低^[13-15]。运用这种方法不但可以区分感染抗体和疫苗抗体,而且在钩端螺旋体病的早期诊断中有潜在的优势。在我国,辛晓芳等^[16]通过对犬用钩端螺旋体病 ELISA 检测方法的研究,成功地建立了犬用 ELISA 钩体抗体检测方法。此研究为我国犬用钩体抗体检测提供了一种简便快速的方法,具有重要的实用价值。

3 总结与展望

犬传染病常用检测技术中的细菌培养、动物接种、细胞培养等方法特异性强,但费时费力,而且需要先进的仪器设备,检测成本高,不易推广使用;PCR(聚合酶链式反应)受影响的因素很多,很容易出现假阳性结果;免疫胶体金技术、乳胶凝集、血凝实验虽然容易操作且成本低,但是其灵敏度低。ELISA 技术有着灵敏度高、特异性强、诊断快速、操作简便,对检测人员和环境危害少等优点。ELISA 用于犬源性人兽共患病检测的研究已

越来越多,技术也更加成熟,相关检测试剂盒陆续被开发和利用。但该技术的研究和开发利用仍存在许多尚待解决的问题,如人工免疫抗原的合成、免疫反应的特异性和抗体选择性方法的标准化方面;在改进样品的纯化步骤,提高灵敏度方面;在减少基底干扰,提高稳定性方面;在简化分析程序,降低分析成本方面。但可以肯定,ELISA 技术在犬传染病及宠物行业检测中有着广阔的应用前景,必将发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Messling V V, Cattaneo R. Amino-Terminal Precursor Sequence modulates canine distemper virus fusion protein function[J]. *Virology*, 2002, 76(9): 4172-4180.
- [2] 张国强, 王远征, 王晋等. 狂犬病病毒抗原定量检测方法的建立[J]. *中国生物制品学杂志*, 2008(1): 166-168.
- [3] 赖红青, 何嘉仪. 应用 ELISA 方法检测犬狂犬病血清抗体试验[J]. *现代农业科技*, 2008(5): 188.
- [4] 孙招金, 薛素强, 刘晓慧等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(3): 204-206.
- [5] 于咏兰, 付丽娟, 汪明. 北京地区犬猫弓形虫病血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2006, 42(5): 7-9.
- [6] 郑红星, 祁珊珊. 兰州地区宠物犬弓形虫病血清学检测分析[J]. *中国动物检疫*, 2010, 27(8): 47-48.
- [7] 何丹, 韦海涛, 赵景义, 等. 北京地区犬布氏杆菌病血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2009, 45(2): 64-65.
- [8] 张险朋, 蔡奕琪, 朱燕秋, 等. 东莞市犬猫布鲁氏菌病血清学调查[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010, (8): 72-73.
- [9] 陈伟业, 王淑杰, 王永, 等. 重组布氏杆菌 BP26 蛋白和 OMP31 蛋白作为间接 ELISA 诊断抗原的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(6): 518-522.
- [10] 赵焜, 姜平, 伊日盖, 等. 犬布氏杆菌外膜蛋白 Omp31 基因的原核表达病抗体的研究[J]. *畜牧与兽医* 2009, 41(9): 34-37.
- [11] 赵焜. 犬布鲁氏菌流行病学调查及其外膜蛋白 Omp31 原核表达与 ELISA 抗体检测方法研究[D]. 江苏南京: 南京农业大学, 2009.
- [12] 刘伯淳. 检测犬钩端螺旋体的新方法[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2000(8): 10
- [13] 顾舒舒, 张凯. 犬钩端螺旋体病的诊治研究进展[J]. *中国畜禽种业*, 2008(3): 152-155.
- [14] Hartman E G, VanHouten M, Frik J, et al. Humoral immune response of dogs after vaccine eat in against leptospirosis measured by an IgM-and IgG-specific ELISA[J]. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 1984(7): 245-254.
- [15] Hartman E G, VanDenIngh T S G A M, Rothuizen J. Clinical pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. an evaluation of the IgM-and IgG-specific ELISA[J]. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 1986(7): 261-271.
- [16] 辛晓芳, 贺争鸣, 秦进才, 等. 犬用钩端螺旋体抗体 ELISA 检测实验研究[J]. *微生物学杂志*, 2006, 26(5): 53-54.

CTX-M型超广谱 β -内酰胺酶研究进展

冯建昆¹, 吕婧玉¹, 冯建英², 张海清²

(1. 河南农业大学牧医学院, 河南 郑州 450002; 2. 鹤壁市畜牧局, 河南 鹤壁 458030)

摘要:近年来, 由于第三代头孢菌素和单环 β -内酰胺抗菌药物的开发和广泛使用, 许多细菌产生质粒介导的能水解头孢噻肟等第三代头孢及氨基糖苷类等单胺类抗生素的超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs), 尤其是CTX-M型ESBLs, 呈逐年增加的趋势, 目前在世界各地广泛、快速地传播, 甚至在局部地区出现爆发流行。本文就CTX-M型ESBLs的起源、流行病学、遗传特性和遗传背景进行综述。

关键词: CTX-M型ESBLs; 流行病学; 遗传特性; 遗传背景

中图分类号: S816.73

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0004-03

CTX-M型ESBLs的结构基因有876个核苷酸, 编码291个氨基酸, 分子量为28kD(Toho-2除外, 它由289个氨基酸残基组成)。已发现的这些CTX-M型ESBLs的等电点(pI)范围为7.4~9.0^[1]。另外, TEM型和SHV型ESBLs是在广谱酶TEM-1、2和SHV-1的基础上发生1~4个氨基酸的突变而来, 而CTX-M型ESBLs没有相应的广谱酶基础, 目前认为其超广谱活性可能是其本质特征而不是几个位点突变的结果。据有关报道, CTX-M型和TEM型或SHV型的同源性较低, 仅为40%^[2]。目前发现的CTX-M型ESBLs种类超过107种, 根据其氨基酸序列的差异(大于94%的相同序列认为是一个群, 小于90%的相同序列认为是不同的群)分为5个群^[3]: CTX-M-1群包括CTX-M-1、CTX-M-3、CTX-M-10、CTX-M-12、CTX-M-15、FEC-1、CTX-M-22、CTX-M-23、CTX-M-28、CTX-M-55和CTX-M-79; CTX-M-2群包括CTX-M-2、CTX-M-4、CTX-M-4L、CTX-M-5、CTX-M-6、CTX-M-7、CTX-M-20和Toho-1; CTX-M-8群包括CTX-M-8; CTX-M-9群包括CTX-M-9、CTX-M-13、CTX-M-14、CTX-M-16、CTX-M-17、CTX-M-19、CTX-M-21、CTX-M-27、Toho-2和CTX-M-24; CTX-M-25群包括CTX-M-25和CTX-M-26。

1 CTX-M型ESBLs的起源

抗坏血酸克吕沃尔菌(*Kluyvera ascorbata*)天然产的CTX-M型酶命名为KLUA。这类酶大部分属于CTX-M-2群。抗坏血酸克吕沃尔菌IP15.79产的KLUA-2型酶与肠炎沙门菌鼠伤寒血清型(*S. enterica* serovar typhimurium)的CTX-M-5型的特性相同^[4]。乔治亚娜克鲁维菌(*Kluyvera geo-*

rgiana)CUETM4246-74产的 β -内酰胺酶KLUG-1和CTX-M-8型酶仅有1个碱基差异^[5]。从克鲁维菌属天然产 β -内酰胺酶和获得CTX-M型酶氨基酸的序列关系来看, CTX-M-2群和CTX-M-8群分别起源于抗坏血酸克吕沃尔菌和乔治亚娜克鲁维菌的天然酶。栖冷克雷维菌(*K. cryocrescens*)天然产的CTX-M型酶已经被研究分析, 这种酶命名为KLUC-1, 与它关系最密切CTX-M-1群中的酶仅有85%~86%的同源性。KLUC-1型酶也许可以形成第六个CTX-M群, 但是这种酶在临床菌株中还没有被发现。CTX-M-1群、CTX-M-9群和CTX-M-25群的来源目前还不清楚, 有待进一步研究。

2 CTX-M型ESBLs的流行病学

1986年, Matsumoto等^[6]用实验动物犬做 β -内酰胺类抗生素的药代动力学试验时, 从粪便中分离出1株耐头孢噻肟的大肠杆菌, 其产生一种非TEM、非SHV型的ESBLs, 命名为FEC-1。1989年初, 德国Bauernfeind等^[7]在临床上分离出1株耐头孢噻肟的大肠杆菌菌株, 它产生一种非TEM、非SHV型的ESBLs, 命名为CTX-M-1。同年, 耐头孢噻肟的沙门氏菌在南美爆发流行。后来研究发现, 在这些地区的耐头孢噻肟的 β -内酰胺酶等电点呈碱性, 对头孢噻肟的耐药程度远远高于头孢他啶, 对头孢噻肟有高度的水解活性, 但它对酶抑制剂敏感。

1992年, 产同样类型ESBLs临床大肠杆菌菌株被报道, 它是在1989年初法国的来自意大利籍的一位病人身上分离出来的。同年, Barthelemy等^[8]对这种酶进行了测序, 命名为MEN-1, 它与TEM和SHV型酶仅有39%的同源性。它是第一个测序的质

粒介导产生的非 TEM、非 SHV 型 ESBL。数年以后, Ishii 等^[9]报道了一个和 MEN-1 相关的酶, 同源性和为 83%, 命名为 Toho-1, 它是在 1993 年日本分离出的一株耐头孢噻肟的大肠杆菌产生的。两个非 TEM、非 SHV 型的 ESBLs 编码基因序列揭示了 CTX-M-1 和 MEN-1 是同一种酶, 且是 Toho-1 的一个突变体。CTX-M-2 是在 1990 年阿根廷从耐头孢噻肟的沙门氏菌中分离出来的。在波兰, Gniadkowski 等^[10]发现了一个 CTX-M-1 型的变体, 命名为 CTX-M-3, 它是在 1996 年从不同的肠杆菌科家族中成员中分离出来的。几年后, 对 FEC-1 编码基因测序发现 FEC-1 型酶与 CTX-M-3 型酶仅在信号肽上有两个碱基的不同。此后, CTX-M 型酶在 ESBLs 家族中迅速增长起来, 并且传播到世界各地和在更广泛的临床菌株中转移, 尤其是肠杆菌科成员。它们也存在环境中的克鲁维菌属中。

3 CTX-M 型 ESBLs 的遗传特性和基因环境

3.1 遗传特性

在临床分离菌株中, CTX-M 编码基因通常位于大小在 7~160 kb 质粒上。bla_{TEM-1} 基因通常与其共同存在同一个质粒上, 并且也可能与 bla_{TEM-2}, bla_{OXA} 或 bla_{SHV-1} 基因型相关。这些质粒可以携带多种抗药性基因, 包括氨基糖苷类、氯霉素类、磺胺类、甲氧苄胺嘧啶和四环素类。

携带 CTX-M 的质粒经常能够在体外通过接合的方式进行传递。每个供体细胞的转移频率在 10⁻⁷~10⁻² 之间。这种特性解释了携带有 bla_{CTX-M} 基因型的质粒很容易传播和扩散。据报道^[11], 在波兰携带有相同的耐药基因 bla_{CTX-M-3} 的质粒在肠杆菌科 7 种不同的细菌中均有发现。但是, 有关研究发现^[12], 编码 pI843 的 CTX-M-17 的质粒片段大小为 7 kb, 其序列已全部明确, 但是通过接合实验并没有获得该基因, 然而, 非接合性的质粒通常可通过转化途径而转移。

最近研究发现, 相同的 bla_{CTX-M} 基因可具有不同的遗传载体支持。日本研究发现^[13], 临床分离株大肠 HK56 中存在第二染色体插入 bla_{CTX-M} 基因, 它包含 3 个拷贝的基因。在波兰华沙, 相同 bla_{CTX-M-3} 编码基因却位于两种截然不同的质粒上^[14]。最近, 中国发现的一个 CTX-M 型 ESBLs 基因可同时出现于大肠埃希菌和阴沟肠杆菌的质粒和染色体上^[15]。这些资料显示了 bla_{CTX-M} 基因的可移动性, bla_{CTX-M}

基因可以在质粒间、质粒和染色体间进行转移。

3.2 遗传背景

CTX-M 型 ESBLs 的广泛流行, 与它的基因结构密切相关。目前认为, 不同的遗传元件参与了 bla_{CTX-M} 基因传播与表达, 常见的遗传元件有 ISEcp1 或类似 ISEcp1 插入序列、转座子和整合子。

3.2.1 ISEcp1 或者类似 ISEcp1 插入序列 ISEcp1 或者类似 ISEcp1 的插入序列已经在编码 CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-3、CTX-M-9、CTX-M-13、CTX-M-14、CTX-M-15、CTX-M-17、CTX-M-19、CTX-M-20 和 CTX-M-21 基因的 ORFs 上游的 42~266 bp 间发现, 也存在于质粒介导的 ampC 基因上^[16]。它由两个不完全重复的反向重复序列和编码 420 个氨基酸的转座酶的 ORF 组成。Stapleton^[17]研究发现 ISEcp1 可能通过一个末端转位过程完成了下游 DNA 序列的转移。质粒转化试验已经证明了 ISEcp1 参与了 bla_{CTX-M} 的转移。另外, bla_{CTX-M-17} 的启动子区域, 通过引物扩增在类似的 ISEcp1 的 3' 末端发现了 -35 区 (TTGAAA) 和 -10 区 (TACAAT), 可能促进了 bla_{CTX-M} 基因表达。其它的 IS 也可能与 bla_{CTX-M} 基因的移动有关, 例如 IS10 和 IS26, 已经分别在 bla_{CTX-M-8} 和 bla_{CTX-M-1} 的上游被发现, IS903 在 bla_{CTX-M-16} 和 bla_{CTX-M-17} 基因的下游被发现。

3.2.2 转座子 转座子 (transposon, Tn) 是一类基因组中可独立移动的 DNA 片段, 可在细菌的染色体、质粒或噬菌体之间自行移动的遗传成分, 是一段特异的具有转位特性的核苷酸序列, 故又称为“跳跃基因”或移动基因。它分为两类: 简单和复合型转座子。简单转座子就是插入序列 (insertion sequence, IS); 复合型转座子 (composite transposon) 是一类携带特殊功能基因 (如耐药基因、重金属抗性基因、糖发酵基因、肠毒素基因、结构基因等) 的转座子, 序列长度超过 2 kb (2 000~8 000 kb), 其两端臂的末端为反向重复序列, 末端能被整合酶所识别, 与插入功能相关。大部分 CTX-M 耐药基因是由转座子控制的, 其它 β -内酰胺酶如 MIR-1、CMY-2、DHA-1、ACC-1 均被证实可以通过转座子进行传播^[18]。

3.2.3 整合子 整合子 (integron) 广泛存在革兰氏阴性菌中, 它由 5' 端的核心区和 3' 端的结构基因组成, 核心区编码 DNA 整合酶, 并包括重组位点的短序列; 结构基因区包括 1 个或多个基因盒的中心序列, 通过整合子的整合酶催化, 以插入形式存

在于整合子中,并通过整合子上的启动子作用得以表达。许多耐药基因(编码抗氨基糖苷类、 β -内酰胺类,氯霉素、TMP等)存在可移动的基因盒中。一个整合子可捕获1个或多个基因盒,被捕获的基因盒5'端与attI接合,3'端的59be与attC(59be重组位点)发生位点特异性重组,成为整合子的组成部分。它是造成多重耐药的一个重要原因。

研究发现^[19],CTX-M-9和CTX-M-2的编码基因在整合子(如InS21、In35和In60)中发现。这些整合子包含有5'端的保守区(5'CS)和部分或全部3'CS的副本。基因盒子位于5'CS和第一个拷贝的3'CS之间。2个3'CS之间有一段含有ORF513的2100bp保守区和一个不包含基因盒的可变区。对于整合子InS21,它是一种非寻常整合子,CTX-M-2的编码基因在3'端保守序列内,位于ORF513的下游。CTX-M-2基因的移动过程则可能有I类整合子的参与^[20]。对于In60,CTX-M-9的基因在整合子In60的3'端保守序列中出现,也位于ORF513的下游。因此,ORF513可编码一个确定的位点特异性DNA重组区,该重组区能从染色体捕获基因。ORF513下游的28bp保守区被认为是ORF513重组区的识别位点。该保守区中的17bp的片段也存在ISEcp1序列下游,揭示了复杂的转移过程可能涉及ORF513重组区和ISEcp1插入序列。

综上所述,近年来,随着抗菌药物在兽医临床的广泛应用,细菌对抗菌药物的耐药性日趋严重。产生超广谱 β -内酰胺酶是细菌对 β -内酰胺类抗生素耐药最重要的机制之一。自首次发现ESBLs以来,产ESBLs菌株已分布到全球各个角落,并且ESBLs的基因型和数量还在迅速增加,它们的流行呈增长趋势。CTX-M型ESBLs之所以呈广泛性流行,这与它的基因结构密切相关。CTX-M型ESBLs的结构基因位于质粒上,且大多携带有转座子和基因盒。例如:插入序列ISEcp1元件是bla_{CTX-M}发生转移的一个关键遗传元件,并且已经证明可作为高水平表达CTX-M酶的启动子序列。由于转座子和基因盒的存在,bla_{CTX-M}基因可以实现在质粒与质粒,质粒与染色体之间的传播。

参考文献:

- [1] 张元章,王沙燕,卢月梅,等.产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌CTX-M型基因的检测[J].中国微生物学杂志,2004,16(6):342-344.
- [2] Cartelle M, Del-Mar-Tomas M, Molina F, et al. High-level resistance to cefazidime conferred by a novel en-

- zyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(6):2308-2313.
- [3] Bradford D, Gardovska G, Storch, et al. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of Salmonella typhimurium in Latvia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 42:1980-1984.
- [4] Hudelist G, Pacher-Zavisin M, Singer C F, et al. Use of high throughput protein array for profiling of differentially expressed proteins in normal and malignant breast tissue[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 86(3):281-291.
- [5] Matsumoto Y F, Ikeda T, Kamimura, et al. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 32:1243-1246.
- [6] Bauernfeind A H, Grimm, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 18:294-298.
- [7] Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, et al. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40:509-513.
- [8] Barthelemy M J, Pe' duzzi H, Bernard, et al. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of Klebsiella oxytoca[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1122:15-22.
- [9] Ishii Y A, Ohno H, Taguchi S, et al. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from Escherichia coli[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39:2269-2275.
- [10] Cniadkowski M, Schneider I, Palucha A, et al. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1 enzyme[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42:827-832.
- [11] Baraniak A J, Fiett A, Sulikowska W, et al. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46:151-159.
- [12] Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of Klebsiella pneumoniae encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(12):1212-1217.
- [13] Yagi T, Kurokawa H, Senda K, et al. Nosocomial spread of cephem-resistant Escherichia coli strains carrying multiple Toho-1-like beta-lactamase genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(12):2606-2611.
- [14] Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, et al. Concurrent outbreaks of extended-spectrum β -lactamase produ-

家畜繁殖性状基因 LH β 的研究进展

李 杰¹, 张金波², 陈 斌^{1*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 石门县畜牧水产局, 湖南 常德 415300)

摘 要: 促黄体素是由脑腺垂体碱性细胞分泌的一种糖蛋白质激素, 在动物(包括人类)的繁殖过程中起重要作用。本文介绍了国内外在促黄体素的结构与性质、生物学活性、LH β 基因的多态性及其与家畜繁殖性状的关系等方面的研究进展。

关键词: 促黄体素; LH β 基因; 产仔数

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0007-03

促黄体素又称黄体生成素(luteinizing hormone, LH), 是一种糖蛋白激素, 由脑腺垂体碱性细胞合成并分泌, 然后由促性腺激素刺激释放。LH与卵泡刺激素(FSH)一样是诱发排卵的主要因素之一, LH参与内膜细胞合成雌激素, 与FSH协同促进卵泡生长成熟, 诱发排卵, 促进黄体生成。

关于LH的研究开始于20世纪20年代。1920年, Zondek和Aschheim首次提出雌性动物的垂体可能含有两种分别刺激卵泡成熟和促使排卵后形成黄体的物质; Smith等(1927)研究证明动物垂体与性器官有密切的联系; Ferold等(1931)最先成功地将垂体提取物分离为两种不同的成分, 后被其他学者证实并定名为FSH和LH^[1]。

LH在动物繁殖中通常用于诱导排卵、预防流产、治疗卵巢疾病和治疗公畜不育。随着研究的深入, 发现LH对动物的繁殖力有很大影响, 许多研究显示LH基因可能是动物高繁殖力的候选基因。本文将综述LH的结构与性质、生物学特性、LH β 基因的多态性及其与家畜经济性状关系等方面的研究进展。

1 LH的结构与性质

促黄体素由 α 和 β 亚基非共轭结合而成, 其相对分子质量约为30 000~35 000, 其糖类物质的含量约占6%~30%。 α 亚基是促性腺激素所共有, 但是 β 亚基具有决定激素分子特异性的功能, 能够识别适当的靶组织, 与特异性受体相结合, 从而决定了该激素的特异性^[2-3]。因此, 编码 β

亚基的LH β 基因的结构发生变化, 就可能会导致动物相关的生殖机能发生变化^[4]。

据报道, α 亚基基因中含有4个外显子和3个不同大小的内含子, 成熟的mRNA大概含有730~800个核苷酸^[5]。对于不同动物, 其 α 亚基十分相似, 无激素间特异性和中间特异性。研究结果表明, 羊的LH的 α 亚基由96个氨基酸残基与两个碳水化合物链组成, 而 β 亚基则由119个氨基酸残基和1个碳水化合物链组成。另外, 研究发现, 牛与羊的LH α 亚基相同, 猪与人的LH α 亚基有95%相同。哺乳动物中的LH β 亚基为单拷贝基因, 其中包括3个外显子和2个内含子。LH β 基因的mRNA约700个核苷酸, 其中第一和第三外显子只有部分编码氨基酸。研究发现, 它能够编码一个由21个氨基酸组成的信号肽和一个由121个氨基酸组成的多肽。对于LH β 基因的研究发现, 不同品种动物的LH β 亚单位的核苷酸和氨基酸排列顺序差异较大。如牛和羊的LH β 肽链几乎完全一致, 而猪的LH β 的一级结构与羊的有15个氨基酸残基的差异, 人的LH β 亚基与羊的只有76个氨基酸残基相同。LH β 基因具有较强的保守性, 可能与LH在动物生长发育中具有重要的功能密切相关。李利等^[6]测定了山羊LH β 基因部分序列, 测得各山羊品种LH β 基因的长度平均为929 bp, 其中1~136 bp为5'非翻译区(136 bp), 163~459 bp为intron1(297 bp), 628~862 bp为intron2(235 bp), 第一外显子长26 bp, 第二

收稿日期: 2012-09-10

*: 通讯作者

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-36)

外显子长 168 bp, 其余 67 bp 为第三外显子部分区域; 南江黄羊 LH β 基因部分序列 GC 含量为 65.23%。对照别的物种的 LH β 基因碱基组成发现, GC 含量大部分都在 60% 以上。

2 LH 的生物学特性

LH 所特有的生物学特性由 LH β 亚基决定, 在不同的物种之间, LH β 的特异性高于 LH α 亚基。LH 的生物学作用是在垂体内促进卵泡发育成熟并分泌雌激素。在卵泡成熟时, LH 是触发排卵的主要激素, 排卵后 LH 又能刺激颗粒细胞转变为黄体细胞并分泌孕酮。LH 对卵泡发育的影响主要集中在卵泡的后期及排卵前期, 但事实上, LH 对腔前卵泡的发育也有着重要的作用。Flaws 等^[7]通过体内试验发现, LH 很可能对小卵泡的发育有着积极影响。这些很可能是因为 LH 会诱导早期膜细胞的分化, 而早期膜细胞的分化对以后的卵泡及卵母细胞的发育起关键作用。随着卵泡的发育, 部分卵泡优先发育被选择确立为优势卵泡。Campbell 等^[8]研究发现 LH 在卵泡的选择发育上, 对卵泡优势化起重要作用。优势卵泡确立以后, 卵泡内的雌激素迅速增加, LH 开始对颗粒细胞进行调节, 促使卵泡排卵。大量研究表明, 多胎绵羊品种具有较高的 LH 水平, 而且排卵率高的品种的血浆 LH 峰值出现时间较早。张英杰等的研究结果表明, 高繁殖力和常年发情的小尾寒羊全年各月份、每个季节以及全年和发情期的血浆中 LH 平均浓度均高于 ($P < 0.0001$) 低繁殖力和季节性发情的细毛羊^[9]。然而, Bartlewski 等^[10]研究发现, 高繁殖力的 Finn 绵羊与低繁殖力的西方白面绵羊血浆的 LH 浓度无显著差异 ($P > 0.05$)。因此, LH 血浆浓度与繁殖力的确切关系还有待深入的研究。

LH 还能促进雄性动物睾丸间质细胞合成并分泌雄激素以及一些生长因子, 且对副性腺的发育和精子的成熟有促进作用, 最终对精子形成起决定作用。研究发现, LH 还是维持生精不可缺少的激素, 且在抑制生精细胞凋亡过程中也有重要作用。LH β 基因在动物的受精卵着床、性腺发育及功能调节中的一系列作用使 LH β 的研究具有重要的价值。

3 LH β 基因的多态性及其与动物繁殖性能的关系

国内外对 LH β 基因的研究多集中在人类生殖疾病方面^[11-13], 但考虑到 LH 基因在卵泡成熟及黄体形成过程中的重要作用, 国内学者对 LH β 基因与动物繁殖性状的关系进行了一些研究。近年

来有关 LH β 亚基的研究表明, 编码 LH β 亚基基因结构的变化往往会使动物的生殖过程出现障碍, 可见 LH β 亚基基因对动物的生殖过程发挥着重要作用。Kumar^[14]通过建立 LH β 基因敲除小鼠模型阐明了该基因对哺乳动物繁殖性能的影响。敲除了 LH β 基因的小鼠能存活但出生后性腺不再发育, 没有繁殖能力。敲除了 LH β 基因的雄性小鼠睾丸变小, 血浆和睾丸内的睾酮水平降低。这些都说明, LH β 基因与动物的繁殖性能存在密切的关系。

猪的 LH β 亚基由 121 个氨基酸构成, 其编码基因含有 3 个外显子和 2 个内含子。王爱华等^[15]利用 SSCP 分析对二花脸猪、约克夏和长白猪的 LH β 的单核苷酸多态性进行了研究, 发现该基因的 3 个外显子和 3' 调控区内没有任何 SNPs 位点, 仅在内含子 I 的 1376 位点和内含子 II 的 1823 位点发现 2 个 SNP 位点。师庆伟^[16]采用 PCR-SSCP 结合测序的方法研究了民猪、长白猪及其杂种猪的 LH β 基因多态性, 检测到外显子 2 中只存在一个 SNP 位点, 利用最小二乘分析得出 LH β 基因的 AA 型有利于东北民猪的高繁殖性能的结论。

近几年关于 LH β 基因多态性在羊中的研究报道较多, 狄冉等^[17]的研究表明山羊与绵羊的 LH β 基因核苷酸序列相似性为 98%, 并检测到济宁青山羊 LH β 基因外显子 2 存在 C \rightarrow T 突变, 该突变与山羊的产羔数极显著相关 ($P < 0.01$), 推断出该位点可能与控制济宁青山羊高繁殖力的主效基因存在连锁关系。黄勤华等^[18]在对 30 只贵州黑山羊母羊的 LH β 基因序列分析中也发现多态性, 138 bp 处的碱基由 G 变成 C 形成 AA 和 AB 两种基因型, 其产仔数差异显著, AB 型比 AA 型平均产仔多 1.02 只。刘源等^[19]采取 PCR-SSCP 技术在湖羊 LH β 5' 调控区发现 4 个多态性位点和外显子发现 2 个多态性位点, 并且湖羊 LH β 基因平均产羔数 AB 型比 AA 型多 0.45 只 ($P > 0.05$), 这与黄勤华等在贵州黑山羊的研究相同。任珍珍等^[20]采用直接测序法检测黔北麻羊的 LH β 基因发现 2 个单碱基突变, 在外显子 2 第 414 位点发生了由 C \rightarrow T 碱基突变, 与狄冉、储明星等在第二外显子 210 位点检测的 C \rightarrow T 突变相同, 但与李利等^[6]在第二外显子 543 位点检测的 T \rightarrow C 突变正好相反, 得到的基因型间的产羔数差异不显著。孙瑞萍等^[21]研究发现 LH β 基因 P1 和 P5 位点均对产羔数有显著影响, 这与邓铮在绵羊上的研究结果不同, 但 P5 位点对产羔数的影响与

师庆伟等在猪的研究结果相同。

动物的繁殖性能主要受母畜的排卵数与公畜的精液品质影响,刘继丰等^[22]采用 PCR-SSCP 的方法对西门塔尔牛和夏洛来牛的基因的多态性进行了研究,并在基因的外显子 2 中检测到一个 SNP 位点,然后对 LH β 基因型进行了分析。结果发现,AB 基因型频率最高,射精量和冻精畸形率适中,相比较其他基因型而言,AB 型精子密度、冻精活力和冻精顶体完整率都较高。由此得出 LH β 基因可能是影响精液品质的主效基因之一,或者与精液品质的主效基因具有紧密连锁,并且 AB 型为优势基因型。

4 展望

动物的繁殖性状属于低遗传力的性状,常规的育种技术很难使繁殖性能有很大的改变。目前,已证实与产仔数有关联的基因有雌激素受体基因(ESR)、视黄酸受体基因(RAR)、催乳素受体基因(PRLR)、褪黑素受体基因(Me1R)和促卵泡素受体基因(FSH)等。最近的有关 LH β 多态性研究表明,LH β 也可能是影响产仔数的候选基因,但尚不清楚其在控制产仔数方面的真正机理。LH β 基因与其他影响产仔数的基因之间存在的关系尚有待进一步的研究。在动物育种实践中,在对产仔数的遗传标记进行综合选择时,可将 LH β 基因作为与产仔数相关的辅助选择的遗传标记之一。随着研究水平与技术手段的进一步提高,有关 LH β 基因表达的调控的机理必将得到深入的阐明;生产实践中,LH 在动物繁殖领域的应用必将会更加广泛。

参考文献:

- [1] 王建辰. 家畜生殖内分泌学[M]. 北京:农业出版社,1998:65.
- [2] Sherman G B, Heilman D F, Hoss A J, et al. Messenger RNAs encoding the beta subunits of guinea pig (*Cavia porcellus*) luteinizing hormone (gpLH) and putative chorionic gonadotropin (gpCG) are transcribed from a single-copy gpLH/CGbeta gene[J]. *J Mol Endocrinol*, 2001, 26(3):267-80.
- [3] Grzegorz P, Maria M, Bo ella S. The involvement of luteinizing hormone(LH) and Pregnancy-Associated Glycoprotein(PAG) family in pregnancy maintenance in the pig[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 4(2):143-163.
- [4] 陈绚丽, 杨菁, 徐馨明. 黄体生成素 β 亚基 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变与卵巢早衰的关系研究[J]. *武汉大学研究生学报:医学版*, 2004, 20(2):56-58.
- [5] 李俊杰, 贾青, 田树军. 雌性哺乳动物 LH 及其受体的研究进展[J]. *黄牛杂志*, 2003, 29(3):26-29.
- [6] 李利, 张红平, 吴登俊. 南江黄羊 LH β 基因多态性与繁殖性能的相关分析[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(10):3-5.
- [7] Flaws J A, Abbud R, Mann R J, et al. Chronically elevated Luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary[J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57:1233-1237.
- [8] Campbell B K, Scaramuzzi R J, Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle[J]. *Journal of Reprod Fertil(Supplement)*, 1995, 49:335-350.
- [9] 张英杰, 刘月琴, 储明星. 小尾寒羊高繁殖力和常年发情内分泌机理的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(6):510-516.
- [10] Bartlewski P M, Beard A P, Cook S J, et al. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy [J]. *J Reprod Fertil*, 1999, 115(1):111-124.
- [11] Ramanujam L N, LIAO W X, ROY A C, et al. Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility[J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(4):925-928.
- [12] Berger K, Billerbeck A, Costa E, et al. Frequency of the allelic variant(Trp8Arg/Ile15Thr) of the luteinizing hormone gene in a Brazilian cohort of healthy subjects and in patients with hypogonadotropic hypogonadism[J]. *Clinics*, 2005, 60(6):461-464.
- [13] Takahashi K, Karino K, Kanasaki H, et al. Influence of missense mutation and silent mutation of L β subunit gene in Japanese patients with ovulatory disorders[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2003, 11(5):402-408.
- [14] Kumar T R. Functional analysis of LHbeta knock-out mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 269(1-2):81-84.
- [15] 王爱华, 李宁, 吴常信. 猪 LH β 亚基基因的单核苷酸多态性研究[J]. *遗传*, 2002, 24(6):649-652.
- [16] 师庆伟, 王希彪. 促黄体素(LH) β 亚基基因的单核苷酸多态性及其与猪繁殖性状的相关性[J]. *江苏农业科学*, 2006(6):302-304.
- [17] 狄冉, 梁琛, 储明星, 等. 促黄体素 β 基因多态性及其与济宁青山羊产羔数的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(8):1171-1178.
- [18] 黄勤华, 张超, 胡万林, 等. 贵州黑山羊促黄体素 β 基因多态性及其与产羔数的关系[J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(6):162-164.
- [19] 刘源, 应诗家, 吴福荣, 等. 绵羊 LH β 基因多态性与繁殖性能的相关性[J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(2):325-330.
- [20] 任珍珍, 罗卫星, 蔡惠芬, 等. 黔北麻羊 LH β 基因多态性及其与产羔数的相关分析[J]. *山地农业生物学报*, 2010, 29(2):135-138.
- [21] 孙瑞萍, 王利心, 王建刚, 等. 山羊 LH β 基因多态性与产羔数的相关分析[C]. 第十五次全国动物遗传育种学术讨论会论文集, 2009:385.
- [22] 刘继丰, 赵志辉, 戴立胜, 等. 促黄体素 LH β 基因的单核苷酸多态性与牛精液品质的相关分析[J]. *畜牧与兽医*, 2009:41(10):8-12.

犬传染性气管支气管炎相关的呼吸道病毒研究概况

翁善钢, 陆明辉, 王晏罡

(外高桥出入境检验检疫局, 上海 200137)

摘要: 犬传染性气管支气管炎或犬窝咳是世界各地的犬类中常见的一种疾病。引起该病的病原有多种, 包括犬副流感病毒、犬腺病毒、支气管败血波氏杆菌、支原体、马链球菌兽疫亚种、犬疱疹病毒以及犬呼肠孤病毒-1、2、3型等。几种病原的混合感染能够加重疾病的严重程度。近些年, A型流感病毒以及冠状病毒感染成为引起犬类急性呼吸道疾病的重要病原。本文主要介绍了上述常见的犬呼吸道病毒。

关键词: 犬; 犬窝咳; 呼吸道疾病

中图分类号: S856.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0010-05

传染性气管支气管炎(Infectious tracheobronchitis, ITB)或犬窝咳(kennel cough)是一种具有急性 and 高度传染性的呼吸系统疾病。该病主要影响犬的喉、气管和支气管,偶尔也会影响到鼻黏膜和下呼吸道。受影响的犬会出现轻度到严重的发作性咳嗽、呼吸窘迫等特征性的临床症状。ITB广泛分布于世界各地,被认为是犬类中最流行的传染病之一。群养状态下的犬患有该病的可能性远大于单独饲养的犬。因此,在宠物店、流浪宠物收养所、警犬训练中心以及肉犬养殖场等地生活的犬很容易患ITB。

ITB主要有两种常见的临床表现形式。一种为简单形式,在临床上最为常见。主要特征是干咳,还常常伴有窒息、干呕等症状。该病通常具有自限性,主要是由气管以及支气管的病毒感染引起的。还有一种复杂形式,通常出现在幼犬或者免疫能力受损的犬中。复杂形式中,病犬肺部会出现继发性的细菌感染,咳嗽常伴有粘液排出。病情可以进一步发展成为支气管肺炎,严重的可以导致死亡。

有多种病毒、细菌等微生物被认为是引起ITB的病原。临床上,同时分离到多种病原的情况也很常见。使用某一种病原微生物进行人工感染实验往往也能够引起疾病的轻度或者亚临床感染形式,这也说明该病是由多种病原共同引起的。不少病原微生物在ITB的发生过程中起着重要作用,如犬副流感病毒(canine parainfluenza virus, CPIV),犬腺病毒(canine adenovirus, 管败血波

氏杆菌(Bordetella bronchiseptica),支原体(mycoplasma)等。马链球菌兽疫亚种(Streptococcus equi subsp. zooepidemicus)能够单独或者与其他病原共同引起犬类严重甚至致命的呼吸系统疾病。

最近几年,在美国的犬类中出现了A型流感病毒(influenza A virus)疫情的爆发,起初被误诊为ITB^[1]。除此之外,一种新出现的犬冠状病毒(canine coronaviruses, CCoV)——CCoV II型的泛亚热带变种(pantropic variant)^[2]和犬呼吸道冠状病毒(canine respiratory coronavirus virus, CRCoV)也能够从有或无症状的犬的呼吸道中检测到^[3]。有时犬疱疹病毒(Canine herpesvirus, CHV)和呼肠孤病毒(reovirus)-1、2和3型也能够从具有窝咳症状的犬上分离到,但这些病原对ITB的发生起着怎样的作用尚不清楚。目前已有针对部分上述病原的疫苗用于疾病预防,但疫苗效果不尽如意,很容易出现免疫失败。本文将主要介绍与ITB的发生有关的病毒性病原体。

1 犬腺病毒2型

犬腺病毒2型(CAV-2)能够引起呼吸道轻度感染,被认为是引起ITB的常见病原之一。CAV-2还能够引起肠炎。具有神经症状的犬的大脑中也可以分离到CAV-2。

1961年,在加拿大的一只患有喉气管炎的犬上首次分离到了该病毒^[4],称为Toronto A26/61株,起初被认为是犬腺病毒1型(CAV-1)的减弱毒

株。随后的研究显示,两者在结构和抗原性上存在不同,因此 A26/61 被认为是一种独特的犬腺病毒的原型,被命名为 CAV-2。对 CAV-1 和 CAV-2 的全基因组序列分析显示,两种核苷酸的相似性仅 75%。尽管两者具有一定的遗传和抗原相关性,但两者的组织嗜性不同。CAV-1 主要侵犯血管内皮细胞和肝、肾实质细胞,而 CAV-2 则主要侵犯呼吸道上皮细胞和肠上皮细胞。

CAV-2 的宿主包括多种哺乳动物。野生动物可能是家犬感染的一个重要来源。如澳大利亚的欧洲红狐 (*Vulpes vulpes*) 中,具有 CAV-2 抗体的占 23.2%^[5]。在美国加州的海峡群岛,岛狐 (*Urocyon littoralis*) 群中抗体流行水平达 97%^[6]。CAV-2 的感染途径是口鼻。病毒在无纤毛的支气管上皮细胞、鼻黏膜、咽和扁桃体隐窝的表层细胞,气管的粘液细胞,2 型肺泡上皮细胞等中复制。除了这些组织外,病毒也可以从咽和支气管淋巴结以及胃肠道中分离到。病毒感染 3~6 天后达到复制的高峰。此后随着抗体的产生,病毒复制的量迅速降低。通常在感染 9 天之后,CAV-2 便分离不到了。呼吸道症状往往同支气管上皮细胞的损伤一致。2 型肺泡细胞受到感染后间质性肺炎的发生相关。犬仅单独感染 CAV-2,很少会显示自发性疾病的迹象。如果有其他细菌或者病毒感染参与则可以观察到 ITB 综合征。

CAV-2 抗体可以用血凝抑制、琼脂凝胶扩散、病毒沉淀、补体结合和中和实验等方法检测到。抗体的保护力同中和抗体水平有关。鼻或咽拭子最合适病毒分离。犬肾细胞已被成功地用于分离和培养 CAV-2。免疫荧光实验常用于检测肺脏组织的 CAV-2 抗原。已有用于检测 CAV 的 PCR 方法被建立起来。此外,可用于区分 CAV-1 和 CAV-2 的 PCR 检测方法也有报道^[7]。

改良型活 CAV-2 疫苗可以有效地减少 CAV-2 在犬群中的传播。犬免疫了 CAV-2 疫苗能够产生针对 CAV-1 和 CAV-2 的免疫保护力。与此相似的是,犬免疫 CAV-1 的疫苗也能够产生针对 CAV-1 和 CAV-2 的免疫保护力。不过,使用 CAV-2 疫苗能够减少 CAV-1 疫苗引起的一些副作用。幼犬体内的母源抗体有可能干扰疫苗免疫的效果。肌肉注射免疫据称可以用于克服母源抗体的干扰。目前尚无可用于滴鼻免疫的产品被批准上市。

2 犬疱疹病毒

犬疱疹病毒是疱疹病毒科 (Herpesviridae) α -疱疹病毒亚科 (Alphaherpesvirinae) 的一个成员。有关 CHV 的报道最早出现于上世纪 60 年代中期。2 周龄以下的幼犬感染 CHV 后会导致致命的广泛性坏死和出血性疾病。不过 2 周龄以上的幼犬以及成年犬通常不显示出任何临床症状。日龄较高的犬感染病毒后一般仅限于呼吸道。CHV 也可以穿过胎盘传播,导致胎儿死亡。血清学调查研究显示,CHV 感染在犬类中的流行率较高。英国的犬中 CHV 抗体的流行率达 88%。比利时和荷兰分别为 45.8% 和 39.3%^[8]。CHV 的宿主一般仅限于犬类,不过也有其他野生动物检测到 CHV 抗体的报道。

由于尚无某一 CHV 毒株进行全基因序列测序,因此 CHV 的基因结构尚未确定。已有的一些研究显示,CHV 的结构同 α -疱疹病毒亚科的其他病毒相似。从遗传学的角度来看,CHV 同猫疱疹病毒 1 型 (feline herpesvirus type 1, FHV-1),海豹疱疹病毒 1 型 (phocid herpesvirus 1) 以及马疱疹病毒 1 型和 4 型的亲缘关系较近。

无论是有症状还是无症状地感染病毒,CHV 在犬类中潜伏感染的现象很普遍。有时,感染几个月甚至几年后,病犬会突然向外排毒。潜伏的病毒可以被一些应激因素、具有免疫抑制性的药物(如类固醇)或者抗淋巴细胞血清等激活。

采用 PCR 方法检测显示,潜伏的病毒可以持续存在于三叉神经节。此外,腰腹骶神经节、扁桃腺、腮腺、唾液腺也有检测到病毒报道。从患有 ITB 的犬类中也可以检测到 CHV,但 CHV 在 ITB 的发生过程中起着如何作用仍然存在不少争议。人工感染实验显示,CHV 可以引起鼻炎和咽炎等轻微的临床症状。对一个宠物收容所的犬类进行的一项长期研究显示,肺脏和气管样品中 CHV 的检出率分别为 9.6% 和 12.8%。与 CRCoV 和 CPIV 不同的是,CHV 感染被检测出的时间通常在病毒被引入犬群 3~4 周之后。CRCoV 和 CPIV 则通常在感染犬类 1~2 周后就能被检测到。有趣的是,CHV 感染往往同较为严重的呼吸道症状有关。但 CHV 感染的存在是否能够加重疾病的严重程度尚不清楚。

在欧洲,自从 2003 年以来就有针对 CHV 的灭活以及亚单位疫苗。疫苗主要用于怀孕母犬的免疫,对于新出生的仔犬具有较好的免疫保护力。

3 犬流感病毒

流感是对于人类、猪、马、禽类等具有重要经济意义的呼吸系统疾病。A型流感病毒粒子的直径在80~120 nm之间,脂质囊膜外有500个呈放射状的纤突,长度为14 nm。病毒基因组为单股RNA,共分为8个独立的片段。纤突蛋白、血凝素(hemagglutinin,HA)、神经氨酸酶(neuraminidase,NA)能够引起中和抗体反应,也是病毒分型基础。A型流感病毒根据H和N抗原不同,可以分为许多亚型,H可分为15个亚型(H₁~H₁₅),N有9个亚型(N₁~N₉)。其中仅H₁N₁、H₂N₂、H₃N₂主要感染人类,其它许多亚型的自然宿主是多种禽类和动物。其中对禽类危害最大的为H₇N₇和H₅N₁亚型毒株。猪群中引起疾病的主要是H₁N₁和H₃N₂亚型。H₇N₇和H₃N₈亚型的毒株被认为同马发病有关。

多年来犬类一直被认为不是流感病毒的易感宿主。上世纪80年的一项研究称,采用血凝抑制实验和血清中和实验的方法,从犬类的血清中检测到了人流感病毒的抗体。关于犬类中存在A型流感病毒爆发的正式文献记载最早出现在2004年。当时,美国佛罗里达州的灰色赛犬(racing greyhounds)中出现了严重呼吸道疾病疫情的爆发^[1]。此外,2004年和2005年在美国各地的宠物犬中也出现了类似的呼吸道疾病。从这些病例中分离到的病毒能够凝集禽红细胞。回顾性的血清学调查显示,这些病毒有可能在2004年之前就已经存在了。对灰色赛犬中分离到的病毒进行分子生物学分析显示,犬类的流感毒株接近于马流感病毒H₃N₈亚型毒株^[1]。

犬流感在临床上有两种截然不同的形式,有些疫情的发病和死亡率可达100%。不过临床上大部分病例的发病形式比较温和,主要症状是发热,然后连续咳嗽10~14天,最后恢复健康。咳嗽的形式通常是湿咳,但也有不少犬表现出类似ITB综合征的干咳。出现较多的鼻分泌物通常是由细菌的继发性感染引起的。

有些犬会出现较为急性的发病形式,呼吸道发生出血性症状。急性形式通常伴随有快速地呼吸和高烧(40~41℃)。对因急性形式死亡的病犬进行病例剖检可以观察到肺脏广泛性地出血。肺脏呈红色或红黑色,有较为坚实的触感。轻度的纤维素性胸膜炎也可以观察到。病理组织学观察可

见气管炎、支气管炎及化脓性支气管肺炎等。使用广谱的抗生素类药物可以减轻疾病的严重程度但并不能够控制疾病^[9]。在较温和的疾病形式时,一般会出现绿色的鼻涕,这很有可能是继发细菌感染,通常可以使用广谱抗生素进行治疗。

目前尚无专门针对犬流感的疫苗,但使用针对其他呼吸道疾病病原的疫苗有助于防控这些病原继发感染。常见的消毒剂能够很容易的灭活犬流感病毒。

目前尚无能够快速检测出犬流感病毒感染的方法。出现临床症状后的7天内可以采用血清学方法检测到流感病毒的抗体。常用的实验室诊断方法是,收集新鲜的肺脏或者呼吸道分泌物样品做病毒分离或者RT-PCR检测。

4 犬副流感病毒

关于犬副流感病毒的首次报道出现在20世纪60年代。当时从用做实验动物的犬的上呼吸道中分离到了病毒。之后的研究显示,具有呼吸道疾病的犬中该病毒的感染是很常见的。有学者指出,CPIV同支气管败血波氏杆菌在ITB形成过程中起着关键的作用^[10]。

副流感病毒是哺乳动物和禽类呼吸道中重要的病原体。副流感病毒属于副粘病毒科(Paramyxoviridae)副粘病毒亚科。在抗原特性方面同猿猴病毒5(simian virus 5,SV5)以及猪、牛、羊和猫的副流感病毒相似。对编码病毒融合蛋白的基因进行测序分析显示,CPIV的核苷酸序列同猪副流感病毒有99.3%的相似性,同SV5和人副流感病毒2型的相似性分别是98.5%和59.5%。

CPIV是单股负链RNA病毒,基因组由7个基因组成,用于编码8个蛋白。主要包括核蛋白(nucleoprotein,NP),V/磷酸蛋白(V/phosphoprotein,V/P),基质(matrix,M)蛋白,融合(fusion,F)蛋白,小疏水(small hydrophobic,SH)蛋白,神经氨酸酶(hemagglutinin-neuraminidase,HN)蛋白以及大(large,L)蛋白等。HN蛋白参与细胞附着,启动病毒感染以及介导血凝。此外,HN蛋白具有神经氨酸酶活性的作用。V蛋白阻止干扰素的信号和抑制干扰素合成。病毒同干扰素的相互作用被认为是引起感染的一个关键因素。

CPIV具有高度的传染性,感染率同犬类的密度有关。CPIV感染犬类8~10天后可以从呼吸道

向外排出病毒,能够通过感染病毒的气溶胶直接传播。病毒在养犬场、宠物收容所等犬类密度较高的场所可以迅速传播。具有 ITB 症状的病犬的气管以及肺脏样品中,CPIV 的检出率分别为 19.4% 和 9.6%。此外,不少野生动物中也存在 CPIV 感染。CPIV 感染通常仅限于两周龄以上的犬的上呼吸道。人工感染实验显示,CPIV 能够在鼻黏膜、咽、气管和支气管细胞中复制。自然感染的病例中,同时有其他病毒或细菌感染比较常见,因此症状会更严重些。

临床症状通常出现在感染 2~8 天之后。CPIV 引起的轻微症状一般最多持续 6 天,但若有其他病原体感染会使得病情更为复杂。常见的症状有轻微发热、干咳、鼻腔有水样分泌物、咽炎、扁桃体炎等。较为严重的临床症状常出现在免疫抑制的犬或者未免疫过的幼犬中,症状有嗜睡、发烧、肺炎等。

常见的实验室诊断方法是通过鼻咽和喉拭子样品进行病毒分离。病毒可以使用犬肾来源的原代细胞或者细胞株进行分离培养。通常,首次传代时并不会出现细胞病变,需要采用免疫荧光等实验鉴定。RT-PCR 也可以用于检测鼻咽和喉拭子样品以及肺脏和气管组织中所含的病毒^[11]。采用血凝抑制实验和中和实验等血清学方法能够用于检测 CPIV 抗体。

目前已有针对 CPIV 的减毒活疫苗,含有其他病原的多价疫苗也有相关的报道。这些疫苗的保护效果不是很好,但有助于减轻疾病的严重程度。做好良好严格的消毒工作是防控病毒传播的重要措施。

5 犬呼肠孤病毒

哺乳动物正呼肠孤病毒(Mammalian orthoreoviruses,MRV)是一种无囊膜、双链 RNA 病毒,为呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属的成员。MRV 可以引起各种哺乳动物有或无症状的感染,宿主范围较广。MRV 主要有 3 种不同的血清型,犬类和猫都有上述 3 种不同血清型流行的报道。MRV-1 毒株与 CDV 或 CPV-2 共同感染犬类时能够引起肺炎或者肠炎。发生腹泻的病犬的上呼吸道中能够分离到 MRV-2 和 MRV-3。不过,对于 MRV 在引起犬类发生呼吸道疾病时起着何作用目前仍然尚不清楚。有学者认为 MRV 不能直接产生致病作用,需同其他呼吸道病原微生物协同作用,

加快疾病进程和增加严重程度。对于 MRV 的诊断主要采用细胞分离培养病毒、电镜观察等方法,但这些方法的敏感性较低。用于检测并区分不同血清型 MRV 的 RT-PCR 方法也已有报道。

6 犬呼吸道冠状病毒

冠状病毒科的病毒具有囊膜,病毒直径为 80~160 nm,为正链 RNA 病毒。根据基因组序列分析、基因组结构和抗原关系的分析,冠状病毒可以分为 4 组。冠状病毒的结构蛋白包括纤突糖蛋白,膜糖蛋白以及核衣壳蛋白。血凝素酯酶糖蛋白只出现在第 2 组冠状病毒中^[12]。迄今,已有 3 种不同的冠状病毒在犬类中发现。肠道犬冠状病毒(enteric canine coronaviruses,CCoV)可以分为两种基因型,分别称为 I 和 II 型,属于冠状病毒的第 1 组,同组的病毒还有猫冠状病毒(feline coronaviruses,FCoV)I 型和 II 型,猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus,TGEV),猪呼吸道冠状病毒(porcine respiratory coronavirus,PRCoV),猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus,PEDV)和人冠状病毒 229E 毒株。

犬呼吸道冠状病毒(CRCoV)最早于 2003 年在英国发现。根据遗传进化分析显示,CRCoV 属于冠状病毒的第 2 组,同组的病毒有牛冠状病毒(bovine coronaviruses,BCoV)和人冠状病毒 OC43 毒株。对编码 S 蛋白的基因进行序列分析显示,在核苷酸和氨基酸水平上,CRCoV 同 BCoV 的相似性分别是 96.9%和 96.0%。CRCoV 同人冠状病毒 OC43 毒株的相似性分别是 97.1%和 95.2%。CRCoV 与肠道 CCoV 在抗原性和遗传性方面的相似却较低,在氨基酸水平上,相似率不到 21.2%。采用 RT-PCR 的方法,有或无临床症状的犬类中均可检测到 CRCoV。有一项血清学调查实验显示,北美、英国、日本以及意大利的犬类中 CRCoV 抗体流行率分别为 54.7%、36.6%、17.8%和 32%^[13]。对于不同年龄的犬类中 CRCoV 抗体流行率的研究显示,流行率随着年龄增长而增加,7~8 岁的犬的流行率最高,达 68.4%。使用多种不同的细胞分离培养犬呼吸道中的 CRCoV 的实验均未能成功,这也影响了对 CRCoV 致病机制的研究。

CRCoV 在 ITB 发生过程中的机制尚不清楚。不过,CRCoV 抗体水平呈阴性的犬比有 CRCoV 抗体的

犬更容易发生呼吸道疾病。仅 CRCoV 单独感染可能会诱发亚临床感染或者轻微的呼吸道症状。不过, CRCoV 的复制可以损害呼吸道上皮细胞, 导致继发细菌或其他病毒感染, 引起类似 ITB 的症状。

7 犬冠状病毒泛亚热带变异株

肠道 CCoV 可以对幼犬造成轻度的腹泻, 较为严重甚至致命的腹泻通常是肠道 CCoV 同犬细小病毒 (canine parvovirus), 犬腺病毒 1 型 (canine adenovirus type 1) 或者犬瘟热病毒 (canine distemper virus) 共同感染引起的^[14]。目前已报道的肠道 CCoV 共有两种基因型, 分别是 I 型和 II 型。已有分子生物学检测方法用于区分上述两种基因型, 但临床上两种基因型的 CCoV 混合感染的现象很普遍。

2006 年, 有学者报道了一种高毒力的 CCoV 毒株, 能够引起严重的胃肠道和呼吸系统症状。这一疾病发生在意大利普利亚地区一家宠物店的 7 条犬中。病犬出现了发热 (39.5~40 °C), 嗜睡, 呼吸困难, 呕吐, 出血性腹泻, 神经症状 (共济失调, 癫痫)。出现症状 2 天后病犬死亡。剖检可见发现扁桃体, 肺, 肝, 脾, 肾等有严重病变。可以观察到广泛性的大叶性肺炎, 亚急性支气管肺炎, 胸腔积液等。采用 RT-PCR 的检测方法, 从肠道内容物和肺脏等器官中可以检测到 CCoV-II 型。对这一 CCoV 毒株基因测序显示, S 基因有 38 个核苷酸碱基缺失。将这一分离到的变异毒株进行人工实验可以导致较为严重的系统性疾病, 同自然爆发疫病的临床症状相似。不过, 这一新出现的变异毒株暂时被命名为泛亚热带变异株, 其是否是一种新的 CCoV 基因型尚待进一步研究。

各种新的诊断技术的出现以及分子生物学分析方法的广泛应用对各种呼吸道病毒的病原学以及流行病学研究提供了丰富的信息。但不少病毒的致病机理以及是否在形成 ITB 过程中起着重要的作用尚待进一步研究。随着人类文明程度的提高, 各类伴侣动物的疾病研究早已成为兽医学研究的一个重点。相信随着研究的深入, 犬类的各种呼吸道疾病都能够被有效地防控。

参考文献:

[1] Crawford P C, Dubovi E J, Castleman W L, et al. Transmission of equine influenza virus to dogs[J]. Science,

2005, 310:482-485.

- [2] Buonavoglia C, Decaro N, Martella V, et al. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12:492-494.
- [3] Erles K, Toomey C, Brooks H W, et al. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease[J]. Virology, 2003, 310:216-223.
- [4] Ditchfield J, MacPherson L W, Zbitnew A. Association of a canine adenovirus (Toronto A26/61) with an outbreak of laryngotracheitis (kennel cough). A preliminary Report[J]. Can Vet J, 1962(3):238-247.
- [5] Robinson A J, Crerar S K, Waight Sharma N, et al. Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia[J]. Aust Vet J, 2005, 83:356-361.
- [6] Skilling D E, Evermann J F, Stott J L, et al. Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data[J]. J Wildl Dis, 2005, 41:512-524.
- [7] Hu R L, Huang G, Qiu W, et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction[J]. Vet Res Commun, 2001, 25:77-84.
- [8] Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000[J]. Reprod. Domest. Anim, 2002, 37:299-304.
- [9] Yoon KJ, Cooper V L, Schwartz K J, et al. Influenza virus infection in racing Greyhounds[J]. Emerg Infect Dis, 2005(11):1974-1975.
- [10] Ueland K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway[J]. Vet. Rec, 1990, 126:481-483.
- [11] Erles K, Dubovi E J, Brooks H W, et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42:4524-4529.
- [12] Erles K, Toomey C, Brooks H W, et al. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease[J]. Virology, 2003, 310:216-223.
- [13] Decaro N, Desario C, Elia G, et al. Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy[J]. Vet. Microbiol, 2006, 116:112-118.
- [14] Pratelli A, Martella V, Elia G, et al. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infection by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus[J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2001, 48:385-392.

乐昌市梅花猪保种繁育与推广建设

黎小芬, 黄智明, 徐根学, 李振山, 张文华
(乐昌市畜牧兽医水产局, 广东 乐昌 512200)

摘要: 调查发现, 近年来梅花猪的数量越来越少, 已处于快速消亡的态势, 品种资源受到严重威胁。本文调查了梅花猪现状, 总结梅花猪保种工作取得的成绩和存在的问题, 对梅花猪保种繁育和推广应用前景进行了分析, 为今后梅花猪的保种工作和推广应用提供参考。

关键词: 梅花猪; 保种; 杂交利用

中图分类号: S828.8*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0015-03

梅花猪是优良地方猪种^[1], 属于广东省大花白猪的粤北品系, 因产于韶关乐昌市“梅花镇”而得名。中心产区为梅花、云岩、秀水、沙坪等四个乡镇, 主要分布于韶关市七县三区, 湖南宜章及广东省英德、清远、佛岗等县(市)。梅花猪养殖历史悠久, 据记载^[2], 梅花猪为五代十国时期, 中原人大规模南迁到粤北一带, 其华中猪随人南迁, 后与本地猪杂交, 经长期选育而成的, 是广东较早出现的地方良种猪, 有着悠久的历史。梅花猪是著名地方良种, 我国人民经过上千年艰苦劳动留下来的宝贵财富, 它不仅是我国的也是世界动物资源开发的宝库。正确地认识和开发特有而珍稀的地方品种能激活地方经济或带动区域经济的快速发展, 这已经被无数的事实所证明, 特别是蜚声海内外的梅山猪等的成功提纯复壮更是被畜牧界人士津津乐道。

1 梅花猪现状

2012年3月, 乐昌市畜牧兽医局和韶关学院专家通过走访的形式对韶关市梅花猪产区进行了全面调查, 包括各乡镇现存的梅花猪种猪的数量、饲养方式、平均产仔数。调查结果显示, 整个韶关市现存的梅花公猪只有17头, 梅花母猪有348头(1975年调查产区饲养梅花母猪4 813头^[2]), 大多以农户散养为主, 占76%, 农户散养的梅花猪主要以青饲料配合全价饲料来喂养; 保种场饲养头数占24%, 用全价饲料饲喂。梅花母猪平均窝产仔数仅9.65头, 这比景栋林等^[4]报道的12.36头少了近3头。调查数据表明, 不仅梅花猪的繁殖性能出现下滑的趋势, 而且梅花猪已经到了濒临灭绝地, 品种资源受到严重的威胁, 所以梅花猪的保种工作已经到了刻不容缓的地步。尽管从2000年开始, 韶

市政府就开始实施梅花猪的保种计划, 在全市划分5个保种小区, 乐昌市梅花镇是其保种小区之一, 但由于种种原因, 梅花猪现存的数量越来越少, 希望能够引起国家和政府的重视, 加大对梅花猪保种工作的投入, 使梅花猪的种质资源得以保存下来。

2 梅花猪保种已取得的成绩

2.1 制订了梅花猪的生产性能和体型外貌标准

为了保证纯种梅花猪选育, 必须建立统一的品种标准。通过查阅资料和调查分析, 梅花猪选育要达到的目标如下:

2.1.1 体型外貌标准 体型: 梅花猪的体型较小, 过去有大骨型和细骨型两种^[3], 但现存的梅花猪多为大骨型, 躯长而结实, 皮毛粗糙, 全身骨骼粗壮, 头嘴尾部较粗大, 成熟较晚, 成年猪体重达45~60 kg。毛色: 体躯颜色为黑白花, 白色部分约占全身的2/3, 黑色部分约1/3, 头、嘴、耳朵、臀部及尾部的3/4为黑色, 鼻尖、腹部及四肢为白色, 耆甲部肩胛部多为白色。背腰部分有形状大小不一致的黑白花, 白色间有一条约3~4 cm宽的灰色带。额前多生有白毛, 呈星状或流星状, 全身被毛短而稀, 毛质较软。头部: 头的大小长短与体躯比例适中, 头长约19~22 cm, 宽约12 cm, 额前有菱形状的皱纹, 俗称“寿字头”, 也有横纹状的, 俗称“老虎头”, 嘴筒大小长短适中, 有“瓦筒嘴”之称, 耳朵较大而下垂(长12~16 cm, 宽14~18 cm)。颈部: 较短、粗、平直, 与肩部衔接良好母猪的颈稍细。躯干部: 体躯短, 前躯低后躯高, 背腰阔而微凹, 胸部发育良好, 腹部膨大而下垂, 但不着地, 臀部倾斜。尾: 细而短, 大部分尾长不过飞节。尾上部2/3为黑色, 下部1/3为白色, 尾尖毛生长呈扁形, 当地称鲤鱼尾形。乳头: 对称乳

头数 5~6 对, 分布均匀, 乳房发育良好。

2.1.2 繁殖性能 母猪初产活仔数 8~10 头, 经产 10~12 头; 20 日龄窝重 33 kg 以上, 30 天窝龄 40 kg 以上, 60 日龄断奶育成率达 90% 以上, 平均断奶个体重 7.5 kg 左右; 70 日龄公猪有爬跨行为, 140 日龄的小母猪开始第一次发情。

2.1.3 生长性能 8 月龄后备公猪体重达 45±5 kg, 后备母猪 60±10 kg; 12 月龄公猪体重达 70±10 kg, 母猪 90±15 kg。符合大花白猪的早期母猪体重比公猪大、成年公猪比成年母猪重的特点。

2.1.4 肥育性能 体重在 20~75 kg 阶段的日增重 450±25 g, 饲料利用率为 70%。

2.1.5 胴体品质 达 90 kg 体重时的瘦肉率 36% 左右, 胴体膘厚(6~7 肋间)5.1 cm 以下, 眼肌面积达 19~22 cm²。

2.2 规范了梅花猪保种选育技术措施

保种选育是一项技术性很强的工作, 需要周密的技术方案和相对稳定的环境, 以及强有力的技术措施。研究团队针对梅花猪制订的保种措施如下:

2.2.1 保种模式 群体采用开放式继代选育为基础, 核心群与保种区相结合。选定粤辉种猪场作为梅花猪第一保种基地(场), 老平农场和天然牧业有限公司作为第二保种基地(场), 建立保种核心群。同时在梅花猪主产区的梅花镇、秀水镇、云岩镇和沙坪镇各建立一个保种小区。实行开放式动态保种。在保种小区, 发现主要性状比核心群优秀的个体就选进核心群。上一个世代优秀个体可直接进入下一个世代。

2.2.2 规模调控 各世代猪群规模不变, 核心群公、母比例 1:5。公猪 7 月龄开始配种, 世代近交增量控制在 2.5% 以下。采取随机交配或小群轮回配种。

2.2.3 世代间隔 本方案的最终目的是长时间地将品种及优良基因保存下来, 不急于尽快选优提纯, 因此, 选育工作可结合生产进行, 采取第三胎留种, 两年一个世代, 既可达到保种选育的目的, 又可节约成本。为了充分发挥优良个体的生产效益, 适当延长这些个体的利用年限, 年更新率为 25%。

2.2.4 多留精选 加大选样差, 提高选样效益。每窝等数留种(1 公 3 母), 家系选择与窝选相结合。后备猪培育比例, 公猪 1:5, 母猪 1:3。

2.2.5 饲养管理 各世代采用同一饲养管理方案保持环境条件相对稳定, 以降低环境对生产性能的影响, 增强世代间可比性。

2.2.6 卫生保健 严格坚持卫生防疫制度, 控制疫病发生, 保证猪群健康。

2.2.7 采用先进的测试手段和活体测膘技术, 完善性能测定和繁育记录档案制度, 提高选育准确度。利用育种软件计算结合育种指数, 育种档案实行计算机管理, 科学指导育种工作。

2.2.8 开展技术培训 加大保种选育的技术培训力度, 特别是开展好性能测定培训工作。通过技术培训, 教农户识别纯种的方法, 对农户现饲养的一些含有其他血统的梅花猪, 劝导农户予以淘汰, 或者其后代只做商品猪用, 不能留作母本。

2.2.9 加大对梅花猪保种基地建设的监管力度 在保种区设立保种警示牌, 保种区内严禁搞经济杂交。作好保种基地猪群鉴定, 建立选种选配, 饲养管理技术档案, 其档案实行专人管理。

2.3 改变传统饲养方式, 加强疾病防疫与控制

过去, 梅花猪的饲养以农村散养为主, 饲养管理水平较差、较粗放。每天只以番薯藤、芋头苗、玉米粉、菜叶、米糠等喂养, 所以才会养殖这种总也“长不大”的猪。建立保种基地(场)和保种区后, 利用现代化养猪的理念和方法, 实行全价配合日粮, 提高粗纤维在日粮中的比例(占日粮比例的 16%), 提高了饲养效率, 节约了成本, 保持地方品种的优秀特性和风味; 制定科学免疫程序和疾病防控措施, 有效控制了传染病的发生, 保证了猪群健康。

3 梅花猪保种工作存在的问题

畜禽品种资源是生物多样性的的重要组成部分, 是人类赖以生存和发展的物质基础, 是满足未来不可预见的重要基因库, 是畜牧业可持续发展的保障。合理地保护和利用畜禽品种资源已日益成为有关行政部门和广大科研人员的共识。从 2000 年起, 韶关市梅花猪的保种工作开始启动, 到目前为止, 保种效果不明显, 甚至出现滑坡的趋势。梅花猪保种工作中存在的问题主要有以下几个方面:

3.1 资金投入严重不足, 缺少配套的政策、措施和基础设施

上级政府对梅花猪保种经费投入尚属空白, 缺乏保种计划, 未出台保种的相关政策。韶关市每年仅仅投入 5 万元保种补贴, 杯水车薪, 农民补贴严重不足, 基础设施难以建立。今后要努力争取获得省级甚至国家资金的支持。

3.2 保种体系不健全, 缺少整体布局和规划

省、市、县尚未成立梅花猪种质资源保护协调

机构, 未制订统一的保种利用规划。通过本次调查, 省市县各级都认识到梅花猪保种工作的迫切性, 也开始制定整体保种规划和布局。

3.3 监督管理力度不够, 种质资源优势继续减弱或丢失

缺乏保种和开发利用相结合的最佳模式和运行机制。保种工作是一项长期的任务, 不能总是依靠政府资金的支持。如果保种工作看不到效益, 农户就没有动力。保种工作迅速开展起来后, 梅花猪的数量越来越多, 就可以考虑开展梅花猪的开发利用, 获得一定的经济效益, 才能为梅花猪的保种提供持续的资金来源。

3.4 对梅花猪种质资源研究不力, 品种标准缺乏

对种质资源保护的意义认识不足^[5], 农户对种质资源保护的意识不够, 尚未形成研究利用的学术学科队伍, 品种鉴定无标准。目前为止, 这项工作也逐渐受到重视, 梅花猪保种工作的监督管理和研究队伍已经形成, 也做了许多工作。

4 梅花猪保种繁育与推广应用前景

梅花猪不仅繁殖力高、抗逆性强、耐粗饲、肉质优良, 而且还具有利用年限长、抗病力强、耐热性能好等优点, 是广东乃至国家宝贵的品种资源。保种的目的首先是保证这个品种资源得以延续, 另一个目的就是杂交利用, 为保种提供资金来源。利用地方猪种发展畜牧生产, 一方面可以强化保种, 另一方面可以最大限度地发挥地方品种优势和生产潜能。不久的将来, 势必开发以梅花猪为母本, 杜洛克等外种猪作父本的二元或三元杂交商品猪生产, 这样就可以开发生产优质猪肉, 满足人们对高瘦肉率和肉质鲜美猪肉的需求。通过优质猪肉的开发, 梅花

猪将由于其独特的优秀品质而在国内外市场上大放光彩, 所以应用前景广阔, 市场潜力巨大。

4.1 随着人们生活水平的不断提高, 人们对畜产品的品质、风味的追求越来越高, 地方良种的开发和利用, 是适应市场需求, 实现畜产品多样化的客观要求。届时, 梅花猪将因其独特的风味和其它特点, 需求量将有大幅度的增长。

4.2 随着科学技术的进步, 梅花猪品种结构和经济用途将发生较大改变。传统饲养梅花猪中仅把它作为肉用型, 而通过遗传改良, 其经济类型将增加试验用等类型。

4.3 随着梅花猪的开发利用, 将带动诸如饲养管理、饲料加工、食品加工等相关产业的发展。

4.4 随着对梅花猪的研究开发, 将造就韶关、广东乃至国家的又一名牌, 实施名牌战略, 扩大知名度, 将对促进当地经济发展起良好作用。

由此可见, 开展梅花猪的保种选育和优质猪肉开发研究有着十分重要的理论意义和现实意义, 无论从遗传育种角度, 还是在开发利用角度看, 均有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 广东省畜牧局.《广东省家畜家禽品种志》编辑委员会. 广东省家畜家禽品种志[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1987.
 - [2] 广东省畜禽资源编辑组. 广东畜禽资源汇编[M]. 广州, 1976.
 - [3] 景栋林, 王晔, 邓日烈, 等. 梅花猪的生态分布及其品种特点[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(7): 38-39.
 - [4] 景栋林, 邓日烈, 王晔, 等. 梅花猪的繁殖性能分析[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(5): 57-58.
 - [5] 景栋林, 王晔, 邓日烈, 等. 梅花猪种质资源保护现状与发展策略[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(8): 20-21.
- plasmid-encoded CTX-M types [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 46: 3045-3049.
- [18] Antonio O, Teresa C, Diana Al, et al. CTX-M-10 Linked to a Phage-Related Element Is Widely Disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish Hospital [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(4): 1567-1571.
 - [19] Sabate M, Navarro F, Miro E, et al. Novel complex sult-type integron in Escherichia coli carrying blaCTX-M-9 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(8): 2656-2661.
 - [20] Conza J D, Ayala J A, Power P, et al. novel class 1 integron (INS21) carrying blaCTX-M-2 in Salmonella enterica serovar infantis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 2257-2261.

(上接第6页)

cing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw hospital [J]. J Antimicrob Chemother, 1999, 44(4): 489-499.

[15] Mavroidi A, Tzelepi E, Miriagou V, et al. CTX-M-3 beta-lactamase-producing Escherichia coli from Greece [J]. Microb Drug Resist, 2002, 8(1): 35-37.

[16] Wu S W, Dornbusch K, Kronvall G, et al. Characterization and nucleotide sequence of a Klebsiella oxytoca cryptic plasmid encoding a CMY-type beta-lactamase: confirmation that the plasmid-mediated cephamycinase originated from the Citrobacter freundii AmpC beta-lactamase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 43: 1350-1357.

[17] Humeniuk C G, Arlet V, Gautier, et al. Beta-lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some

当前我国生猪价格波动情况及后期走势判断

虞 华¹, 虞丽娜²

(1. 国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005; 2. 江苏省盐城邮政局, 江苏 盐城 224005)

中图分类号: S828.8⁹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0018-01

“中秋、国庆”双节前夕,养猪业内人士普遍预测生猪价格会小幅上涨,国庆期间全国猪价果然震荡调涨,每公斤销售价格一度突破14.8元。但是双节后,猪价又回落至13.5~14元的水平,到11月初仍在持续。猪市弱势小幅震荡的行情并没有发生根本转变,全国猪价处于“涨不上去、跌不下来”的格局。11月6日全国生猪价格最高地区为新疆,生猪平均价为每公斤16.33元,最低地区为广东,生猪平均价为每公斤13.32元,两地区差异非常明显,全国大部分地区生猪行情都在震荡调整。立冬临近,冷空气频频来袭,早晚温差变大,生猪容易感染发病。生猪养殖户出栏意愿变强,出栏量有所增加。预计全国将迎来新一轮区域猪价调整,短期内全国总体肉猪行情弱势,部分地区将有窄幅下调迹象,因此对CPI暂时不会产生上行压力。

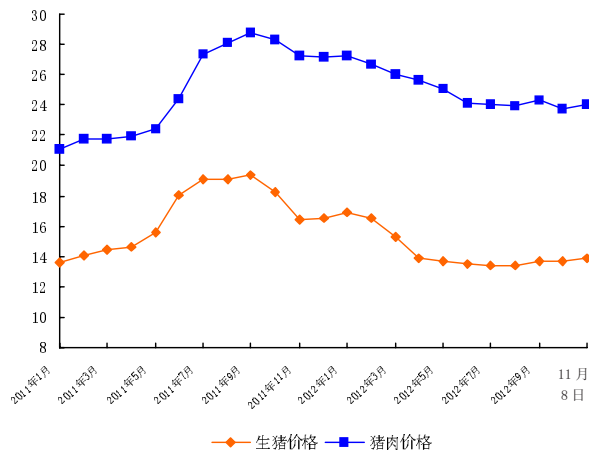


图1 2011年以来全国生猪、猪肉价格走势(元/kg)

1 四大因素导致猪价低迷

一是生猪市场供给充足。国家统计局数据显示,今年前三季度,全国猪肉产量3 754万吨,同

比增长5.2%;生猪存栏46 822万头,同比增长1.9%;生猪出栏49 298万头,同比增长5.1%。统计调查数据还显示:在前三季度商品猪以及母猪存栏量出现上升的过程中,虽然一些中小养殖户开始谨慎甚至停止扩张规模,但大型养殖户依然继续推进其扩张计划。有报告指出:2012年1-8月份,我国种猪进口量超过1万头,比去年同期超出2倍,这说明大型生猪养殖企业依然在通过进口种猪的方式在为未来商品猪的生产规模进行扩张。

二是猪肉进口量激增。今年1-7月份,我国猪肉进口总量累计为31.2万吨,比去年同期猛增1倍;进口平均价格为每吨1 875美元,同比上涨32.2%。其中7月份进口3.9万吨,环比增长10.6%,同比增长34.4%。同时,7月份我国猪肉进口平均价格回升至每吨1 881美元,环比上涨3.8%。

三是猪肉消费疲软期被人为延长。一方面9月份受双节刺激,消费量有所增加,10月份部分需求在双节被释放,从而导致市场需求回暖比较慢;另一方面猪肉消费本来就比较疲软,屠宰场实行“以销定产”的规则,节前为了满足需求,9月下旬提升了屠宰量,节后屠宰量(收购量)马上下降了。所以猪价有了一个空档期,并且比以前延长了。

四是副食品比价变动影响。“中秋、国庆”双节过后,鸡蛋、淡水鱼、蔬菜上市量明显增加,价格普遍下跌,猪价想涨也难。

2 春节前猪价上涨是必然的

目前猪肉需求正处在从淡季向冬至后的旺季过渡期间,需求回升的幅度小、速度慢,总体呈现小幅震荡走势,但弱势明显,易跌难涨。从饲料价

(下转第22页)

东莞市屠宰场待宰生猪口蹄疫抗体水平的检测与分析

李小军^{1,2}, 罗卫强^{1,2}, 王永², 钱贵培², 钟敏菱²

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2. 东莞市动物卫生监督所, 广东 东莞 523007)

摘要:为弄清东莞市生猪定点屠宰场中待宰生猪口蹄疫抗体水平, 本研究对2004-2011年历时8年不同时间段调入东莞市生猪定点屠宰场的待宰生猪进行随机抽血采样, 共7 237份, 采用ELISA和间接血凝试验方法进行检测。结果表明: 2004-2007年普遍抗体水平偏低, 平均抗体水平合格率为23.93%; 2008-2011年抽样合格率分别达到36.08%、76.46%、45.75%、74.39%和51.19%, 较2004-2007年有明显提高, 但仍应加强免疫工作。

关键词: 临宰生猪; 口蹄疫; 抗体; 检测; 分析
中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0019-04

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触传染性和可快速远距离传播的动物疫病, 曾被世界动物卫生组织(OIE)列为A类家畜传染病之首^[1]。FMDV主要感染牛、猪等偶蹄类动物, 以口舌黏膜、皮肤、蹄部形成糜烂、溃疡病灶为特征, 并能引起大范围的流行, 对养殖业构成重大威胁^[2]。科学的免疫仍是目前防控该病的主要手段, 通过监测免疫动物的抗体水平可以评价免疫效果, 也有利于制定有效的免疫程序^[3-4]。

东莞市本地生猪养殖量很少, 95%依靠外省市调入, 健康状况各异, 来源非常复杂(5 000多基地养殖场), 生猪在屠宰场混群过夜容易发生口蹄疫等重大动物疫病。为弄清楚生猪屠宰场中待宰生猪口蹄疫综合抗体水平, 结合东莞实际, 我们对2004-2011年(8年共9个时间段)不同来源的待宰生猪抗体水平进行了检测分析, 以了解生猪在待宰前的免疫抗体水平状况。

1 材料与方 法

1.1 仪器与耗材

96孔110~120V型医用血凝板, 微型振荡器、台式离心机、10~100 μL可调微量移液器、BIO-RAD 550酶标仪。

1.2 试剂盒

口蹄疫O型正向间接血凝抗原试剂盒, 购于中国农业科学院兰州兽医研究所。猪口蹄疫病毒VP1结构蛋白抗体EILSA诊断试剂盒, 上海优耐

特生物医药有限公司生产。

1.3 待检血清

共分9个时间段采集血清标本: 第一时间段是2004年共抽样1 013份血清标本; 第二时间段是2006年11~12月, 共抽样395份; 第三时间段是2007年2~3月, 共抽样1 055份; 第四时间段是2007年3~4月, 共抽样337份; 第五时间段是2008年10月共抽样643份血清样本; 第六时间段是2009年4月共抽样854份; 第七时间段是2010年3~5月, 共抽样824份; 第八时间段是2010年8~11月, 共抽样1 230份; 第九时间段是2011年1~3月, 共抽样886份。

1.4 方 法

第一、第五、第六、第七和第九时间段抽取的血清样品送至广东省农科院兽医研究所用猪口蹄疫EILSA诊断试剂盒检测; 第二、第三、第四和第八个时间段的血清样品用口蹄疫O型间接血凝试剂盒检测, 具体操作按试剂盒说明书进行。

2 结 果

2.1 第一至第四时间段检测结果(2004-2007年)

猪口蹄疫O型抗体抽检从2004年10月至2007年4月历时3年共4个时间段, 在东莞25个生猪定点屠宰厂, 分别对来自湖南、广东、河南、湖北、江西、云南六省80个县市的待宰生猪抽取血清, 共抽取样本2 800份, 总合格率为23.93%(按农业部在全国实行的口蹄疫免疫考核标准, 即

抗体滴度是否达到 1:32 以上来判定免疫是否合格)。各阶段合格率统计结果见表 1。

表 1 2004-2007 年抽检血清抗体合格率统计

项目	第一时间段 (2004)	第二时间段 (2006.11-2006.12)	第三时间段 (2007.2-2007.3)	第四时间段 (2007.3-2007.4)
抽检份数	1013	395	1055	337
合格份数	139	205	213	113
合格率(%)	13.70	51.89	20.19	33.53

2.2 第五时间段检测结果(2008.10)

第五时间段抽检的 643 份样品来源于广东、湖南、福建和江西 4 省的 8 个城市。抽样数和检测结果见表 2。从表 2 可以看出本时间段抽检的抗体合格率整体较低,大多数在 30%~50%之间。其中广东省调入的样品除南海外其余合格率都接近 30%;湖南衡阳合格率 55.38%为本次外省抽样检

表 2 第五时间段抽检血清抗体合格率统计

项目	广东博罗	广东增城	广东东莞	广东惠州	广东南海	湖南衡阳	福建上杭	福建武平	江西上高	合计
抽检份数	195	159	49	76	6	65	20	63	10	643
合格份数	70	46	16	24	5	36	11	19	5	232
合格率(%)	35.9	28.93	32.65	31.58	83.33	55.38	55	30.16	50	36.08

2.4 第七时间段检测结果(2010.3-2010.5)

第七时间段从广东省和湖南省的 7 个城市调入的生猪样品 824 份,抽样数和检测结果见表 4。由表 4 可以看出,除长沙调入的样品合格率较低外,其他各城市的血清抗体合格率较为接近,均在 40%~55%左右。

2.5 第八时间段检测结果(2010.8-2010.11)

第八时间段口蹄疫 O 型正向间接血凝抗原试

测中合格率中最高。

2.3 第六时间段检测结果(2009.4)

第六时间段抽检的 854 份样品来源于广东博罗、增城、东莞和湖南嘉禾 4 个城市。其中博罗调入生猪抽检样品 334 份,增城调入样品数量为 438 份,东莞调入 62 份,湖南嘉禾 20 份(抽样数和检测结果表 3)。从表 3 看出:广东的三个城市中,博罗和增城的样本合格率接近,分别为 77.84%和 77.17%;东莞的合格率低于两者,为 56.45%;嘉禾调入的 20 份样品全部合格。本时间段的抗体抽检合格率较上一阶段有明显提高。

表 3 第六时间段抽检血清抗体合格率统计

项目	广东博罗	广东增城	广东东莞	湖南嘉禾	合计
抽检份数	334	438	62	20	854
合格份数	260	338	35	20	653
合格率(%)	77.84	77.17	56.45	100	76.46

剂盒检测总计 1 230 份血清样本,来源于广东、湖南、福建的 10 个城市的不同地区,各城市调入样品数量及抗体滴度统计见表 5。广东省调入的样品来源于博罗、增城、东莞、惠州、清远、化州 6 个城市,其中博罗、增城、东莞三个城市的抗体水平较高,血清抗体滴度大于 1:128 的分别占 52.05%、59.22%、77.50%。而惠州、清远、化州的合格率较低,血清抗体滴度小于 1:32 的分别占

表 4 第七时间段抽检血清抗体合格率统计

项目	广东博罗	广东增城	广东东莞	广东惠州	湖南长沙	湖南邵阳	湖南衡阳	合计
抽检份数	257	466	30	30	15	16	10	824
合格份数	124	210	15	14	1	9	4	377
合格率(%)	48.25	45.06	50	46.67	6.67	56.25	40	45.75

表 5 第八时间段抽检血清抗体滴度情况统计

抗体滴度	广东博罗	广东增城	广东东莞	广东惠州	广东清远	广东化州	湖南长沙	湖南浏阳	湖南岳阳	福建武平
<1:32	147	7	15	70	16	5	2	27	12	26
≥1:32<1:128	133	4	8	56	20	1	0	15	8	2
≥1:128	304	5	12	183	124	2	3	18	7	10
合计(份)	584	16	35	309	160	8	5	60	27	38

42.86%、43.75%、63.50%。

湖南省的调入的样品来自长沙、浏阳和岳阳。抗体滴度小于 1:32 的分别占 40.00%、45.00%和 44.44%，大于等于 1:128 的分别占 60.00%、30.00%和 25.93%。福建武平调入的 38 样品中抗体滴度小于 1:32 有 26 份，合格率偏低。按农业部在全国实行的口蹄疫免疫考核标准，即抗体滴度是否达到 1:32 以上来判定免疫是否合格，各城市抽检血清抗体合格率统计见表 5。

2.6 第九时间段检测结果(2011.1-2011.2)

第九时间段抽检样品 886 份来自广东、湖南、福建三省 8 个城市。其中广东博罗、增城、东莞、清远、惠州调入的生猪分别为 276、271、68、50、37 份，湖南长沙 93 份、浏阳 51 份，福建武平 40 份(抽样数和检测结果见表 6)。从表 6 可以看出，广东省的 5 个城市中以东莞的合格率最高，68 份样品有 62 份合格，合格率 91.18%，其次是增城和清远，合格率分别达到 71.96%和 68.00%。博罗合格率为 55.8%，惠州合格率仅 24.3%；湖南和福建省调入的样品合格率非常低，长沙、浏阳和武平分别

表 6 第九时间段抽检血清抗体合格率情况统计

项 目	广东博罗	广东增城	广东东莞	广东清远	广东惠州	湖南长沙	湖南浏阳	福建武平	合计
抽检份数	276	271	68	50	37	93	51	40	886
合格份数	154	195	62	34	9	3	2	1	460
合格率(%)	55.8	71.96	91.18	68	24.32	3.23	3.92	2.5	51.92

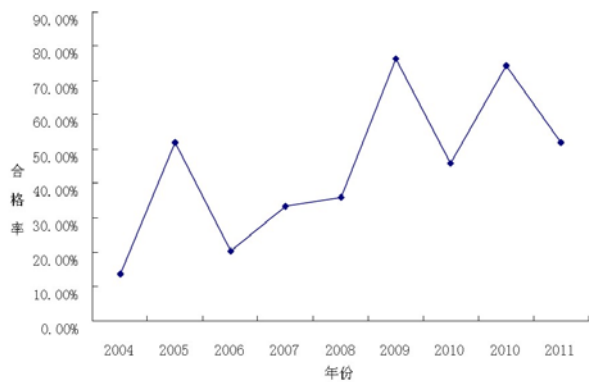


图 1 2004-2011 年东莞待宰生猪口蹄疫抗体水平情况

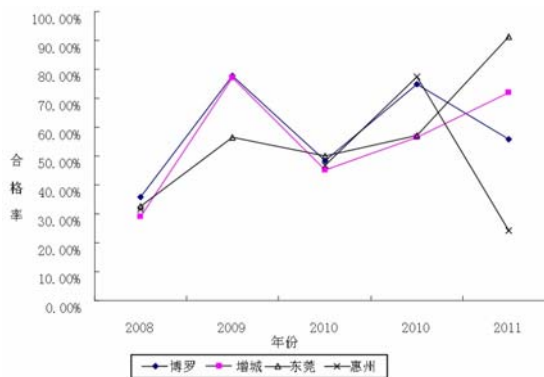


图 2 2008-2011 年东莞待宰生猪主要来源地口蹄疫抗体水平情况

仅为 3.23%、3.92%和 2.50%。

3 讨论

本次调查从总体上了解了 2004-2011 年 8 年 9 个时间段的供莞生猪的口蹄疫抗体水平。一般认为，群免疫合格率在 70%以上的畜群才具有良好的免疫保护力^[5]。从此次调查的情况来看，也仅有部分地区的抽检结果达到了这一标准。有试验表明：口蹄疫病毒侵染家畜后可呈现潜伏感染，并不表现出明显的临床症状，且潜伏感染家畜可长期携带口蹄疫病毒，对口蹄疫的发生与流行有重要的影响^[6-7]。即群体抗体保护率达不到 70%，经过免疫的生猪仍然有少数猪不能抵抗自然感染，有发病的可能^[8]。因此，要想做好免疫预防工作，就必须继续坚持监测猪群的抗体水平^[9-10]。

按时间跨度来看，近年来东莞待宰生猪口蹄疫抗体水平有显著提高。2004-2007 年四个时间段抽样合格率分别为：13.7%、51.89%、20.19%、33.53%；2008-2011 年五个时间段抽样合格率分别达到 36.08%、76.46%、45.75%、74.39%和 51.92%。从图 1 可以看出：2008-2011 年抽样合格率比 2004-2007 年抽检合格率有明显的提高，这说明近年来东莞待宰生猪口蹄疫抗体水平有显著提高。

从各个生猪来源城市生猪的抽检合格率来看，抗体合格率参差不齐，但总体生猪口蹄疫抗体水平是逐步上升的。从图 2 可以看出供东莞生猪主要来源城市(博罗、增城、东莞本地、惠州)的生猪口蹄疫抗体合格率总体趋势，抽检样品的合格率总体上是逐步提高的。

综上所述,近年来东莞市待宰生猪口蹄疫抗体水平总体是上升的,但部分阶段有的城市的样品合格率甚至低于5%,笔者认为造成抽检生猪口蹄疫抗体水平低下的原因是多方面的,如疫苗运输保管不当,免疫程序不合理等;此外,由于口蹄疫疫苗对猪群的应激比较大,使养殖户产生一种对口蹄疫疫苗能不免就不免,能够少免就少免的心理。因此笔者认为,全面防控生猪口蹄疫的关键一环是如何提高生猪养殖户对口蹄疫免疫工作的重视,今后如何采取有效措施加强生猪上市前口蹄疫的免疫,提高待宰生猪口蹄疫的抗体水平,仍然是值得探讨的问题。

参考文献:

- [1] 谢庆阁. 口蹄疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1.
 [2] 崔克, 罗满林, 贺东生, 等. 广东省猪群口蹄疫免疫抗体水平调查[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(11): 17-19.

- [3] 方先珍, 郑立运, 梅娜丽, 等. 河南规模化猪场猪瘟、口蹄疫抗体水平监测与免疫效果分析[J]. 畜牧与兽医, 2010(8): 42.
 [4] 张成莲, 汪仁莉. 规模化猪场口蹄疫抗体水平监测与分析[J]. 养殖与饲料, 2009(11): 1-2.
 [5] DAW E P S, Flangan F O, MADEKUROZWA R L, et al. Foot-and-mouth disease virus from African buffalo to cattle in a wildlife area of Zimbabwe[J]. Vet Rec, 1994, 134: 230-232.
 [6] Hargreaves S K. OIE Scientific conference on the Control of Foot-and-Mouth Disease African Horse Sickness and Contagious Bovine Pleuropneumonia[M]. OIE Paris France, 1991: 9-10.
 [7] 江明甫. 猪口蹄疫疫苗免疫剂量对免疫效果影响[J]. 现代畜牧兽医, 2009(5): 45.
 [8] 陈健雄. 规模化猪场如何控制口蹄疫病[J]. 今日畜牧兽医, 2009(5): 1-4.
 [9] 刘波, 杨先富, 汪俭. 黎平县猪口蹄疫免疫抗体监测及分析[J]. 贵州畜牧兽医, 2010(4): 20-21.
 [10] 陈西钊, 叶春艳. 猪瘟抗体监测及免疫效果分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 457-459.

(上接第18页)

格与宏观流动性来看,短期看不到猪肉价格大幅上升的驱动力。

由于11月初开始从北到南大幅降温,东北和华北地区已迎来大雪,降温明显。因此,若冬天提前到来,南方做腊肉的时间也有可能较往年提前,猪价也可能提前迎来春节前的上涨。玉米价格始终维持弱势震荡,未来一段时间内,随着新玉米上市、饲料原材料成本的下滑,养殖户养殖压力减小,玉米价格仍存下探空间,但是由于成本支撑的因素影响,快速下跌的行情必将加重农户与贸易商的惜售心态,因此玉米价格将以稳定或小幅下滑为主。11月初豆粕市场出现反复涨跌,总体趋势在下滑,下跌幅度不是很大。第四季度是豆粕需求比较旺的季节,如果供应量没有实质性的增加,豆粕价格会继续保持高位,甚至可能会有所上升。

对于未来猪价走势,根据供需形势判断,春节前猪价上涨是必然的,但幅度不会太高,全国生猪均价有望上升到8元/500g,但往上破9的可能性仍然十分渺茫。因为今年乃至明年上半年,生猪的供应仍然极为充足。总体来看,在全国生猪存栏增加背景下,若不出现严重疫情,2012年猪价整

体低于2011年,全年生猪价格可能呈“W”型走势,生猪养殖全年可实现盈利,不会出现大面积宰杀母猪现象。

3 “反周期”调控仍需加强

从目前生猪的供需形势来看,2013年猪价大幅反弹的可能性并不是很大,但抑制“猪周期”不能放松,应从“反周期”的稳定供给上多下工夫。随着国家补贴、收储制度的完善以及养殖规模的扩大等有利因素影响的不断加深,我国的“猪周期”有被拉长延缓的趋势,但目前这些因素还不能完全平抑“猪周期”。

生猪价格上涨时,国家出台了能繁母猪补贴等政策,但价格低迷期间的扶持政策很少。每一次价格高峰期之前,都是生猪产业的一个低迷期,平抑猪肉价格周期性波动,不但要管“高位”更要管“低位”。国家收储制度等作用需要进一步提高,当前还需特别重视防疫工作。重大疫情往往会导致生猪供应出现明显变化,带来价格波动。今年是一个闰年,现在全国各地温度较往年要低,消费旺季有可能提前到来。各大养殖户要继续做好饲养管理,关注疫病发展形势防止饲料霉变,及时调整存栏结构,适时出栏。

水禽禽流感免疫防控关键技术与措施

陈建红, 刘佑明, 张济培, 司兴奎, 张福英, 罗立新, 牛 森
(佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 如何提高水禽禽流感(AI)免疫防控的效果,一直是临床兽医工作者所关注的问题。本文根据“水禽禽流感的免疫防控关键技术研究”所获得的主要成果,从疫苗质量控制、免疫程序制订与实施、免疫效果监测、卫生与饲养管理措施等重要方面陈述了水禽AI防控的技术要点,望对提升水禽AI的防控水平、增加水禽养殖业收益方面有所帮助。

关键词: 水禽; 禽流感; 免疫防控; 关键技术

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0023-04

The Key Technology and Measures on the Vaccination for Prevention and Control of Waterfowl Avian Flu

Chen Jianhong, Liu Youming, Si Xingui, Zhang Fuying, Luo Lixin, Niu Sen
(College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: How to improve the vaccination effect for prevention and control of waterfowl avian flu is always the concerns of clinical veterinary workers. In this paper the waterfowl bird flu prevention and control techniques were stated for controlling vaccine quality, formulating and implementing the immune program, monitoring the immune effect and providing the health measures. It will be useful for increasing the waterfowl avian flu prevention and control level and increasing the income of the farmers.

Key words: Waterfowl flu; Avian influenza; Immune control; Key technology

对于水禽禽流感(AI),近年免疫失败情况时有发生,其原因主要有:(1)AI油乳剂灭活苗效价的监测问题。目前家禽AI油乳剂灭活苗效价的快速检测只能停留在半成品上,成品油乳剂灭活苗的效价尚无有效的快速检测方法。(2)水禽AI免疫监测试验仍使用鸡红细胞为指示细胞做HI试验,受到非特异性凝集的严重影响。(3)水禽AI抗体水平与抗感染关系问题。对水禽尤其是番鸭等,标准尚需明确。(4)水禽AI免疫程序问题。①种属免疫应答有差异;②免疫次数、首免周龄把握不当;③未重视母源抗体对主动免疫的影响;④未能适当运用免疫促进技术和正确处理联合免疫的关系。(5)卫生、饲养管理措施等未得到足够重视。针对以上原因,本文根据本课题组“水禽禽流感的免疫防控关键技术研究”所获得的主要成果,将水禽AI防控的相关技术要点陈述如下,谨供参考。

1 AI油乳剂灭活苗效价快速检测

免疫防控水禽AI,关键之一是AI油乳剂灭活苗质量的监控。目前,该疫苗的质量监控只限于生产厂家在疫苗半成品生产环节中把握,制成疫苗成品后,效检只能依靠实验室条件下的小群家禽进行实际的免疫接种与免疫监测,费时、费力,一直备受关注。本实验室已经建立的“三氯甲烷破乳-HA效检”的AI油乳剂灭活苗效价快速检测方法,对解决该问题具有实际价值。

“三氯甲烷破乳-HA效检”的AI油乳剂灭活苗效价快速检测方法原理是采用三氯甲烷对AI油乳剂疫苗作破乳,经离心获取上清水相抗原,采用红细胞凝集试验检测抗原效价。本方法用材简单,包括被检AI油乳剂灭活疫苗、三氯甲烷、微型漩涡振荡器、高速离心机、1%红细胞悬浮液、移液器、96孔反应板、PBS生理盐水等。其操作程序简易,

收稿日期:2012-10-08

基金项目:广东省2011年省级农业科技推广专项资金项目(粤农计[2011]143号)

将被检 AI 油乳灭活疫苗与三氯甲烷等量混合, 置微型漩涡振荡器震荡 6 min, 再以 8 000 rpm 离心 5 min, 采取析出的上清水相, 按常规方法作 HA 试验, 检测液相样品的 HA 效价, 以此 HA 效价作为被检 AI 油乳灭活疫苗的参考效价。

“三氯甲烷破乳—HA 效检”的 AI 油乳灭活苗效价快速检测方法自本实验室于 2007 年完成试验后不断使用, 获得一些体会。一是 AI 油乳剂灭活苗在制成品后, 会受到诸多影响成品疫苗效价的因素作用。事实上 AI 疫苗出厂后, 在运输、储存过程中存在不少不规范的做法。几年来采用“三氯甲烷破乳—HA 效检”方法对一些进入使用单位的 AI 疫苗作检测, 的确时有发现效价不一和效价低下的样品, 认为需要对这些产品作进一步的质量、效价监控。其二, 采用“三氯甲烷破乳—HA 效检”方法检测 AI 疫苗效价, 关键要注意三氯甲烷振荡处理油乳剂疫苗的时间。试验表明, 比较 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 min 振荡处理时间, 以 6 min 振荡处理时间最佳。振荡处理时间过短则无法充分使成品油乳剂灭活苗破乳, 振荡时间过长, 则三氯甲烷对病毒抗原的损害作用明显。从这点而言, 疫苗振荡后应尽快进行离心, 将液相抗原与三氯甲烷分离并吸出。其三, 对经“三氯甲烷破乳—HA 效检”方法检验的效价不同的疫苗进行实际免疫接种试验发现, 高滴度(如 $4\log_2$)疫苗诱导家禽产生的抗体水平要比低滴度(如 $2\log_2$)疫苗诱导家禽产生的抗体水平高 1~2 个滴度, 表明“三氯甲烷破乳—HA 效检”方法的确能够反映油乳灭活苗的实际质量。其四, 采用“三氯甲烷破乳—HA 效检”方法检验效价特别低(如 $0\log_2$)的疫苗, 在进行实际免疫接种试验时往往也并非完全不能诱导家禽产生相应的抗体(尽管要比高滴度疫苗诱导的抗体水平低), 这种现象与本法在破乳过程对油乳剂灭活苗中流感病毒 HA 抗原存在部分损害有关, 值得在实际应用本法时注意, 也是本法今后需进一步改善的关键点。

2 水禽 AI 免疫监测应注意的问题

水禽 AI 免疫监测是保证水禽群对 AI 始终处于良好的特异抗感染状态的重要措施。笔者认为, 在水禽 AI 免疫监测中需要注意的问题是多方面的, 其中要特别提出注意的有以下四: 其一, 对用于 HI 试验的红细胞供体家禽种类差异认识不足, 使 HI 反应过程出现较严重的非特异凝集。试验表明, AI 免疫鸭血清对几种家禽红细胞的非病毒性凝集性由强至弱依次为鸡>鸭>鹅, 即鸭血清对

鸡红细胞的非病毒性凝集性最强, 往往在 1:4 以上, 对鸭、鹅红细胞的凝集较弱, 绝大多数在 1:2~1:4 以下; AI 免疫鹅血清只对鸡红细胞有凝集, 对鸭、鹅红细胞一般无凝集作用。鉴于 AI 免疫鸭血清用鸭红细胞悬浮液作 HI 试验、AI 免疫鹅血清用鹅红细胞悬浮液作 HI 试验, 测定的 HI 效价数值最稳定, 且可基本消除非病毒性凝集, 其余各种红细胞均存在或多或少的问题。故认为在鸭血清的 HI 检测中, 一般应采用鸭的 1%红细胞悬液作 HI 试验; 在鹅血清的 HI 检测中, 一般除采用鹅的 1%红细胞悬液, 也可采用鸭的 1%红细胞悬液作 HI 试验。其二, 未能根据所用疫苗毒株的变化, 对检测用抗原作相应的更改, 忽视了不同疫苗株之间抗原差异情况。其三, 采血检测时间参差不齐。通常免疫监测有二个最重要的目的, 即—免疫接种后于近期检查禽群抗体是否上升到标准值以上, 于远期检查禽群抗体是否下降至抵抗感染的临界值以下, 以便及时补充或追加接种。试验表明, 小鹅、小水鸭、小番鸭、小白鸭在 2 周龄首免、3 周龄二免共 2 次免疫接种后, 在第 4 周龄期可达到的抗体水平依次为 (3.5~4)、5.5、(4.5~5)、5 \log_2 , 可以作为参考。经过 AI 油乳剂灭活苗 4 次以上免疫接种的成年水禽, 其有效抗体水平维持时间可达 3~5 个月左右, 一般在最后一次接种后第三个月应该开始监视其抗体下降情况。其四, 应当注意免疫监测结果多方面的指标。一般较为注意的监测指标是水禽群抗体的平均值和最低值, 其实还应高度关注其低于标准值的样品数和具体数值情况, 最高值、高—低差值, 还要注意检测时禽群的日龄、免疫次数及检测时距离最后一次接种的时间。观察低于标准值的样品数和具体数值时, 如果低于标准的样品数不超过监测样品数的 10%, 具体数值不低于标准值(2~3) \log_2 , 疫情流行情况不明显, 则在安排补免工作中如遇到困难时可以稍作延缓。观察最高值、高低差值时, 如果可以确认疫苗和接种过程等方面没有问题, 而高—低差值过大, 则应考虑野毒在本禽群存在的可能性, 要特别注意加强消毒卫生、饲养管理, 进一步强化免疫监测跟踪, 有必要时要考虑对野毒的检测鉴定。另外, 确定一个可靠的免疫标准对于正确分析与有效利用免疫监测结果也是非常重要的。试验表明, 当抗体水平达 6.0 \log_2 及以上时, 番鸭对人工接种 HPAIV 具有完全抵抗能力, 不排除, 或体内 SOD 活性和 MDA 含量接近正常的水平。

实际上要保证种水禽群正常生产, AI H₅ 免疫抗体水平应当达到 8.0log₂ 及以上。

3 水禽 AI 参考免疫程序和免疫监测指标

影响水禽 AI 免疫应答的因素较多, 主要的因素有母源抗体水平、首免时间、免疫剂量、免疫次数等。对小白鸭、小番鸭、小鹅等进行母源抗体降解规律探讨和不同首免时间(1 周龄、2 周龄、3 周龄)、不同免疫剂量(0.5 mL/ 只, 1.0 mL/ 只, 1.5 mL/ 只)、不同免疫次数等因素单独试验及组合试验, 同时探讨了成年水禽 AI 免疫抗体消长情况, 结合实际生产需要与利弊, 拟定了以下肉用水禽和成禽的 AI H₅ 油乳剂灭活苗免疫接种参考程序和免疫监测参考指标。

3.1 肉水禽 AI H₅ 参考免疫程序与免疫监测指标

首免: 10~12 日龄, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.2~0.3 mL/ 只; 二免: 20~22 日龄, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.4~0.6 mL/ 只; 35~40 日龄免疫监测; 以 5log₂ 以上为合格。(生长期在 80~120 天的品种, 如肉番鸭和肉鹅, 宜于 55~65 日龄加免 1 次, 剂量为 0.4~0.6 mL/ 只。必要时可与禽 I 型副粘病毒油乳剂灭活苗联合免疫接种)。

3.2 种水禽 AI H₅ 参考免疫程序与免疫监测指标

首免: 10~12 日龄, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.2~0.3 mL/ 只; 二免: 20~22 日龄, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.4~0.6 mL/ 只; 三免: 55~65 日龄, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.4~0.6 mL/ 只; 四免: 产前 15~30 天, AI H₅ 油乳剂灭活苗, 0.6~0.8 mL/ 只。35 日龄免疫监测, 以 5log₂ 以上为合格; 四免后 15~20 天免疫监测以 6log₂ 以上为合格。必要时可与 AI H₉ 或禽 I 型副粘病毒油乳剂灭活苗联合免疫接种。

试验表明, 采用以上程序对小鹅、小水鸭、小番鸭、小白鸭作免疫接种, 在第 4 周龄期抗体水平可分别达到(3.5~4)、5.5、(4.5~5)、5 log₂。以该程序对小白鸭、小番鸭、小鹅用多种不同厂家的 AI 油乳苗作免疫接种和免疫监测也可获得相近的结果, 可供生产参考。

另外, 在实际生产中上述肉禽 AI 免疫程序可根据禽类品种易患其他疫病情况的差异, 适当增加一些其他病种疫苗的接种。例如对小番鸭, 在 1~2 日龄可增加“三周病—白点病二联弱毒疫苗”皮下注射, 1 头份/ 只; 对小鹅, 1~2 日龄可增加小鹅瘟高免抗体注射; 对种番鸭产前可增加“三周病—

白点病二联灭活苗”肌肉注射, 1 mL/ 只; 对种鹅产前可增加小鹅瘟弱毒疫苗, 肌注, 4 头份/ 只, 等等, 在实际生产中尚未见对 AI 免疫有不良影响。

4 提高水禽 AI 免疫防控效果的饲养管理措施

无论是在实验条件下或在实际生产条件下都可发现, 饲养环境对 AI 免疫接种效果具有明显的影响。试验数据可见, 养殖在密度大、光线不足、潮湿、粪便污染严重条件下的平养小鸭, 与饲养在密度适当、光线合适、干爽、清洁卫生状况良好条件下的棚养小鸭相比, 采用同样的免疫程序, 后者抗体水平要比前者高 1~2 个滴度。

提高水禽饲养管理, 应当注意几个方面的技术与措施:

- 1、做好育雏室的准备工作: 彻底打扫, 铲除浮土, 细心冲洗, 喷洒消毒, 充分空置, 备置消毒好的器具, 福尔马林二重熏蒸。
- 2、特别做好 21 日龄内的保育: 高度关注冷暖、饥饿、疏密、动静、通闷, 并及时处理。
- 3、管好密度: 饲养密度过大, 家禽拥挤, 粪便污染严重, 空气污浊, 容易诱发各种疫病; 在选择密度时应当联系实际, 灵活安排。注意不同饲养模式的标准, 注意不同生长阶段的标准, 注意不同季节气候的标准, 注意不同地理环境的标准, 注意肉用、种用禽群标准, 注意禽群的具体反映情况, 尽量采取小群饲养。
- 4、高度关注中成鸭的湿、热应激。
- 5、管好饲料, 对不同品种、不同用途、不同生长发育阶段的水禽应给予相应的全价饲料。
- 6、管好药物疫苗, 防止劣质产品流入, 保证科学储存, 监控使用数量与方法, 跟踪使用效果。
- 7、管理好粪便。如果粪便及时收集下塘或下地, 每亩塘(地)大约可消化 100 只成鸭的排泄。如果粪便不能及时消化, 则会成为恶化环境和传播疫病的重要根源。要管理好粪便, 最好的办法就是实施棚养。棚架搭建要注意一些基本指标。以鸭棚为例, 棚架坐北朝南, 架面用直径 5 cm 竹木杆搭设, 木杆间距约为 3~5 cm; 棚架离岸边约 1 m, 靠水一侧搭造斜坡直入深水区, 斜坡与水面夹角约 40 度; 棚架中部 1/3 面积设人字形顶盖, 材质以杉皮最佳; 棚架两端露天; 四周上下有 40~50 cm 高栅网防止小鸭误跌入或钻入棚架下面水域。在棚顶和棚架间应有可以升降的保温膜, 以在天气寒冷时起保温作用。以往多用竹木为棚架的框架材料, 目前, 逐步已有采用不锈钢为材质的棚架出现, 卫生效果又有更大的改善。
- 8、管好病禽

残禽。及时淘汰病残禽只,尽可能剖检每只病死禽并从中发现潜在的疫病。每天病残禽数要控制在0.01%~0.03%以下,超过此数值则可能为明显疫病流行前兆。9、适当使用免疫促进剂。不少免疫促进剂可以提高水禽机体的非特异抵抗力,若干免疫促进剂经过试验对水禽 AI 油乳剂灭活苗免疫接种具有免疫促进效果,比如福源公司的复合营养剂—紫钻。经过对小鹅、小番鸭、小水鸭、小白鸭的 AI H₅ 油乳剂灭活疫苗免疫接种试验表明,它可明显地提高水禽对 AI 油乳剂灭活苗接种的免疫应答水平。

还有优化接种疫苗的种类,真正落实全进全出制度等等,总之,努力提高饲养管理水平,可以大大提高水禽的身体素质,既有利于提高水禽对 AI 油乳剂灭活苗接种的免疫应答水平,也有利于提高水禽群的整体防疫水平。

5 小结

影响水禽 AI 免疫效果的因素有许多,尤其重要的是要做好疫苗质量的监控,采用科学的免疫程序,正确评介免疫监测的结果等等,此外还要高度重视卫生消毒措施,不断改善饲养管理条件,努力提高家禽机体的特异免疫应答能力和非特异免疫抵抗力,从而使水禽 AI 防控面貌获得根本的改变。

参考文献:

[1] 司兴奎,陈建红,张济培,等.禽流感油乳佐剂疫苗质量快速

检测方法的建立[J].中国家禽,2007,29(14):18-20.
 [2] 司兴奎,张济培,朱燕秋,等.水禽禽流感 H₅N₁ 亚型改良 HI 抗体检测方法的研究[J].中国家禽,2008,30(21):16-19.
 [3] 黄得纯,陈建红,薛立群,等.鸭免疫 H₅N₁ 亚型禽流感油乳剂灭活苗的免疫动态研究[J].中国家禽学报,2005,9(1):162-165.
 [4] 张福英,罗立新,刘佑明,等.雏鸭 AI 母源抗体消长规律对免疫效果的影响[J].中国兽医杂志,2007,43(10):85-86.
 [5] 司兴奎,陈建红,张济培.新城疫-禽流感重组二联活疫苗 rLH₅ 株的免疫效果分析[J].广东畜牧兽医科技,2007,32(3):24-28.
 [6] 司兴奎,陈建红,张济培,等.七种免疫调节剂对鸭接种禽流感疫苗后体液免疫应答的促进作用[J].养禽与禽病防治,2007(10):34-36.
 [7] 张济培,陈建红,廖明,等.番鸭禽流感疫苗免疫效果的研究[J].养禽与禽病防治,2007(4):4-7.
 [8] 张济培,陈建红,廖明,等.番鸭体内 H₅ 亚型禽流感 HI 抗体与抗感染关系研究[J].安徽农业科学,2007,35(18):5435-5438.
 [9] 卢卫红,张济培,陈建红,等.番鸭感染 AIVH₅ 后血液中 SOD 活性和 MDA 的变化[J].湖北农业科学,2007,46(3):430-432.
 [10] 张济培,陈建红,陈响坤,等.肉鹅 H₅ 亚型禽流感疫苗免疫效果的研究[J].中国畜牧兽医,2006,33(12):94-97.
 [11] 卢卫红,张济培,陈建红,等.免疫鹅感染 H₅N₁ AIV 后组织中抗氧化功能的研究[J].湖北农业科学,2008,47(3):324-327.
 [12] 卢卫红,张济培,陈建红,等.鹅感染 AIVH₅ 后血液中 SOD 活性和丙二醛含量的变化[J].黑龙江畜牧兽医,2006(8):64-65.
 [13] 谢海燕,张济培,朱燕秋,等. H₅ 亚型禽流感免疫程序的临床免疫效果检测[J].畜牧与兽医,2008,40(1):111-112.
 [14] 肖智远.禽流感:灾难、对策与反思[J].中国禽业导刊,2004,21(6):11-13.
 [15] 肖智远,林敏,陈丽琴,等.从区域安全角度防控禽流感[J].中国禽业导刊,2004,21(11):15-16.

2012“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 2012 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 2013 年第 1 期公布。

1、**评选范围:**本刊 2012 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

二〇一二年一月十六日

几例慢性仔猪副伤寒的病理观察

聂立欣¹, 于博^{2*}

(1. 肇庆市农业学校, 广东 肇庆 526070; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0027-02

仔猪副伤寒也称猪沙门氏菌病, 是由致病性沙门氏菌引起的仔猪的一种传染病。急性病例为败血症变化, 慢性病例为大肠坏死性炎症。慢性病例可导致仔猪生长发育不良, 很多变为僵猪, 给养殖业造成损失。今年2月份笔者接诊3例慢性副伤寒的病例。现将主要情况作一介绍。

1 发病情况

2012年2月份, 正值广东梅雨季节, 肇庆某猪场饲养1000头断奶仔猪中60%的仔猪发生腹泻, 排水样粪便。发病急的几个小时内死亡, 死亡约70头。未死亡的病猪经采用环丙沙星、磺胺嘧啶等药物进行治疗, 其中有约500头经过治疗恢复正常, 发育良好; 但仍有约30头未死亡猪出现发育迟缓, 变为僵猪。笔者对其中的3头僵猪进行了检查。

2 临床症状

仔猪极度消瘦, 精神状态不佳, 食欲不振, 生长发育迟缓。3月龄猪个体如刚断奶的仔猪大小, 皮肤苍白, 被毛粗糙无光泽, 排黄色的稀粪, 恶臭, 两后肢被粪便污染, 走路不稳, 身体散发臭味(图1、2)。



图1 病猪消瘦, 后肢被黄色稀粪污染

3 病理剖检变化

仔猪皮下脂肪很少, 多处淋巴结略肿大, 呈灰白色(图3)。病变主要在大肠, 包括结肠、盲肠、直肠。表现为肠鼓起, 肠壁增厚变硬。剖开肠壁, 内有

大量黄绿色稀粪, 肠壁粗糙、黑色, 呈严重的坏死性肠炎。用刀刮很难剥离, 强行刮离可见大面积溃疡。其中一严重病例出现结肠与腹壁粘连。(图4、图5、图6)。其他器官和组织未见明显异常。

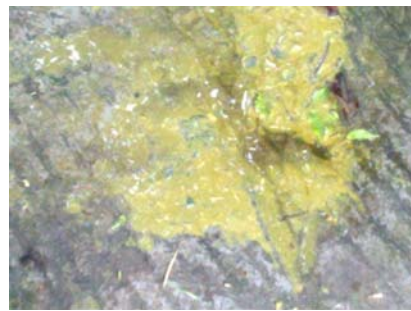


图2 病猪排黄色稀粪, 恶臭味

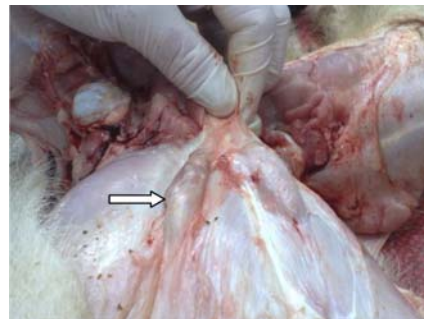


图3 腹股沟浅淋巴结肿大



图4 肠壁与腹壁粘连

收稿日期: 2012-08-09

*: 通讯作者

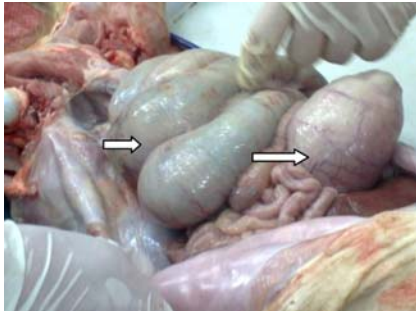


图5 猪大肠壁增厚,鼓气

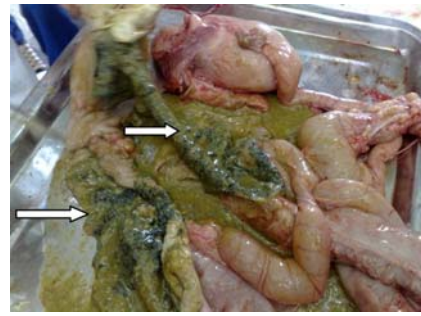


图6 猪结肠呈坏死性肠炎

4 微生物学诊断

4.1 染色镜检

用灭菌环取大肠内容物在琼脂平板中划线,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,24 h 后取出,出现无色透明菌落。取菌落进行革兰氏染色,光学显微镜下发现有大量革兰氏阴性的小短杆菌。

4.2 生化试验

将细菌纯培养物接种于乳糖培养基,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,24 h 后取出,无产气产酸现象。

4.3 鉴别培养

将细菌纯培养物接种于麦康凯培养基中,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,24 h 后取出,出现半透明的无色菌落。

根据发病情况、临床症状、剖检变化、微生物学诊断,确诊为仔猪慢性副伤寒。由于肠壁严重受损,严重影响了仔猪的生长发育,无治疗价值,建议淘汰僵猪。

5 体会

5.1 加强饲养管理

仔猪副伤寒在我国各地的猪场及养猪单位都有发生,预防本病的根本措施应是“预防为主”。该猪场已有近三十年的养猪历史,养殖场的病原微生物种类繁多,再者梅雨季节,天气湿冷,断奶仔猪数量多,畜禽舍内地面潮湿,饲槽未冲洗干净,饲料突然更换等引起仔猪抵抗力下降,因而给细菌的生长创造了重要的条件。故搞好饲养卫生条件,尤其是南方梅雨季节更应注意仔猪断奶前后的饲养管理,如圈舍要及时清除粪便,保持畜舍干净,更换饲料要循序渐进,防止突然更换饲料造成的应激。

5.2 果断淘汰僵猪,切断传染源

发生疫情时要及时隔离治疗,但一旦转变成慢性型,病猪生长缓慢,成为僵猪,虽不死亡,但无治疗价值和经济价值,且其仍会通过粪便等排泄物向外界排菌,可能造成新的感染和疫情扩大,所以应尽早淘汰僵猪,以免造成更大的经济损失。

《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。

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

地 址:广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编:510500)

电 话:020-37245052、37288167 E-mail: gdxmsy@163.com、gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

免疫抗体压力下 PRRSV GD 株 Nsp2 和 GP5 基因变异分析

牛晓芸¹, 李康宁³, 贺东生^{1,2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 广东省兽用生物制品技术研究与应用企业重点实验室, 广东 广州 510640; 3. 中牧实业股份有限公司, 北京 100070)

摘要: 以 PRRSV GD-2007 株为材料, 在自然条件和抗体压力下连续传至 40 代后, 分别命名为 PRRSV-GD-f40 和 PRRSV-GDAb-f40, 进行 RT-PCR, 扩增 Nsp2 基因部分序列和 GP5 基因全长, 克隆并测序。应用序列分析软件将测序结果和已经发表的 PRRSV 毒株进行比对, 结果显示: Nsp2 基因扩增片段大小均为 796 bp, 自然传代和抗体压力下传代后的新毒株和母源毒株的相似性分别为 98.0% 和 97.9%; 扩增的 GP5 基因大小为 603 bp, 编码 200 个氨基酸, 和母源毒株的相似性分别为 99.2% 和 98.8%。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; Nsp2; GP5; 序列分析

中图分类号: S852.659.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2012)06-0029-03

Variation Analysis of the Nsp2 and GP5 Gene of PRRSV (GD strain) under Antibody Selective Pressures

Niu Xiaoyun¹, Li Kangning³, He Dongsheng^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Veterinary Biological Products Technology Research and Application Enterprise Key Laboratories, Guangzhou 510640, China; 3. China Animal Husbandry Industry CO., Ltd, Beijing, 100070, China)

Abstract: PRRSV strain GD was continuously propagated in Marc-145 cells for 40 passages without PRRSV antibody or with PRRSV antibody and the viruses after passages were named PRRSV-GD-f40 or PRRSV-GDAb-f40 respectively. Nsp2 and GP5 genes were cloned and sequenced. Comparison results showed that the amplification fragment of Nsp2 gene of all isolates were 796 bp long and shared 98.0% or 97.9% similarities with maternal strain respectively. The GP5 genome analyses showed that their cDNAs of GP5 were 603bp long and shared 99.2% or 98.8% similarities with maternal strain respectively.

Key words: PRRSV; Nsp2; GP5; Sequence analysis

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)引起的一种传染性疾病,以妊娠母猪流产、产死胎、木乃伊胎等繁殖障碍,及新生和断奶仔猪呼吸系统疾病为主要特征^[1],可引起免疫抑制及继发感染。PRRS 自 1987 在美国首次发现,随后许多国家和地区均有报道,目前已经遍及北美、欧洲及亚洲。我国于 1996 年郭宝清等首次报道发现 PRRSV^[2]。

PRRSV 为动脉炎病毒科动脉炎病毒属成员,单

股正链 RNA 病毒,基因组全长 15Kb,含 8 个开放性阅读框(ORFs)^[3]。其中,ORF1 编码 12 个非结构蛋白(Nsp1~12),Nsp2 在各毒株间差异较大,不同基因型间的相似性仅为 32%^[4]。ORF2~ORF7 编码 6 种结构蛋白,ORF5 编码的 GP5 为囊膜糖蛋白,可诱导机体产生中和抗体^[5],在病毒的复制、致病与免疫机理、遗传变异等方面也有重要作用。在所有的结构蛋白中 GP5 是变异最大的蛋白^[6-7],欧美两型病毒间的氨基酸相似性只有 52%~55%,同型毒株间氨基酸相似性在 88%~99%之间。对 Nsp2 和 GP5 基因

收稿日期:2012-10-11

*:通讯作者

基金项目:国家自然科学基金(31072138)

变异的研究可以在一定程度上反映病毒整个基因组序列的变异情况。有研究表明, PRRSV 在特异性抗体作用下连续传代可以发生变异^[8], 本研究以 PRRSV GD-2007 株为材料, 在自然条件和 PRRSV 抗体压力下连续传到 40 代后, 进行 Nsp2 基因部分序列和 GP5 基因全长序列的克隆和序列分析, 进而分析长期应用疫苗对广东地区 PRRSV 变异趋势的影响, 为该地区 PRRS 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、菌株和质粒

Marc-145 细胞为华南农业大学兽医学院传染病教研室保存, PRRSV GD-2007 毒株为华南农业大学兽医学院传染病教研室分离并保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞为华南农业大学兽医学院传染病教研室制备; 载体 pMD18-T 为 TaKaRa 公司产品。

1.2 主要试剂

TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒为天根生化科技有限公司产品, M-MLV、RNase Inhibitor、dNTP、EXTaq 聚合酶、DL2000、购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量纯化试剂盒均为 Omega 公司产品, DMEM、小牛血清为 GIBCO 公司产品。

1.3 引物设计及合成

参照 GenBank 中已发表的 PRRSV 全基因组序列, 用 Primer 5.0 软件设计 2 对引物, 分别用于扩增 Nsp2 部分基因和 GP5 基因全长(表 1), 设计好的引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

表 1 Nsp2 基因和 ORF5 基因引物设计

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	扩增长度(bp)
Nsp2F	CAACACCCAGGCGACTTCAGAAATG	886
Nsp2R	CCAAGTCAGCATGTCAACCCTATC	
GP5F	ATGTTGGGGAAGTCTTGACC	603
GP5R	CTAGAGACGCCCATTTGTTCCG	

1.4 病毒增殖

待 Marc-145 细胞长成单层后, 接种 PRRSV GD-2007 株, 孵育 1~2 h, 弃去病毒液添加不同稀释度的 PRRSV 抗体, 筛选抗体最适稀释度, 然后在自然条件和最适抗体浓度下繁殖病毒, 当细胞出现 80% 以上病变时, 收获病毒悬液, 如此方法连续传 40 代, 命名为 PRRSV-GD-f40 和 PRRSV-GDAb-f40。

1.5 病毒总 RNA 提取及 RT-PCR

取病毒悬液, 按照 TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒总 RNA。

反转录后进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 63 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C

延伸 1min, 共进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 16 $^{\circ}$ C 保温, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物的克隆载体及序列测定

将上述经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测条带正确的 PCR 产物参照 Omega 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行纯化回收, 回收产物按照一定的比例与 pMD18 Simple-T 载体连接过夜, 重组质粒转化 DH5 α 感受态, 用含氨苄的 LB 培养基筛选阳性菌落, 菌液 PCR 鉴定, 构建亚克隆质粒, 将经过菌液 PCR 鉴定及酶切鉴定阳性重组质粒送北京奥科鼎盛生物技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增

PRRSVD-2007 株为模版, 用 Nsp2 和 GP5 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 均出现一条特异性条带(图 1)。

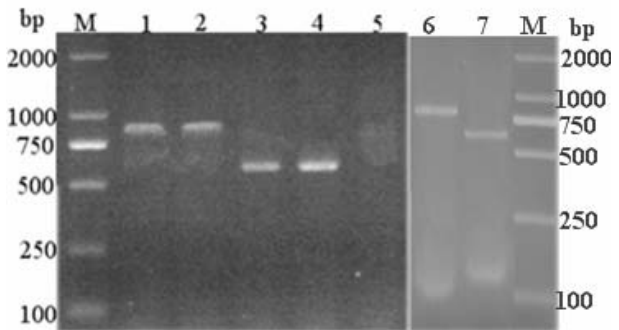


图 1 Nsp2 和 GP5 基因 RT-PCR 扩增图

M: DL2000 Marker; 1-2: PRRSV-GDAb-f40 Nsp2 扩增产物; 3-4: PRRSV-GDAb-f40 GP5 扩增产物; 5: 阴性对照; 6: PRRSV-GD-f40 Nsp2 扩增产物; 7: PRRSV-GD-f40 GP5 扩增产物

2.2 菌液 PCR 和酶切鉴定结果

将纯化的扩增产物与 pMD-18T 连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 阳性克隆摇菌过夜后进行菌液 PCR 鉴定, 提取质粒进行 EcoR I 和 Xba I 双酶切鉴定分析(图 2), 结果证实重组质粒构建正确。

2.3 基因序列分析

2.3.1 Nsp2 核苷酸序列分析 序列测定结果显示 PRRSV-GD-f40 和 PRRSV-GDAb-f40Nsp2 基因编码区均为 796 bp, 比预期片段预期结果少 90 bp (分别位于第 2590~2592 位及第 2743~2829 位)。为了比较 PRRSVGD-2007 株在自然条件和抗体压力下传代后 Nsp2 氨基酸和母源毒株及各地区 PRRSV 代表株相似性, 选取 GenBank 上已经报道的 PRRSV 代表毒株序列, 用 DNA-Star 软件进行分析。结果表

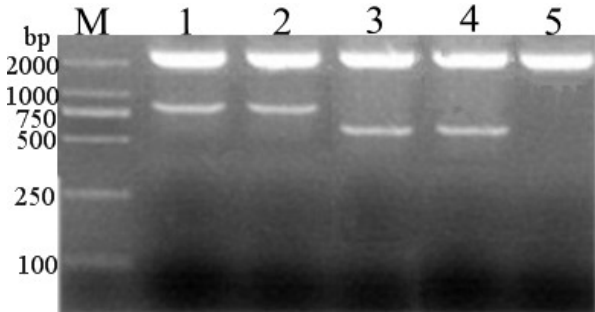


图2 Nsp2 和 GP5 基因酶切图

M: DL2000 Marker; 1: PRRSV-GD-f40 Nsp2 酶切产物; 2: PRRSV-GDAb-f40Nsp2 酶切产物; 3: PRRSV-GDAb-f40GP5 酶切产物; 4: PRRSV-GD-f40GP5 酶切产物; 5: 阴性对照

明(图3): PRRSV-GD-f40 和 PRRSV-GDAb-f40 和母源毒株的相似性分别为 98.0%和 97.9%, 与 PRRSV 经典株 LV 株、VR-2332 株、CH-1a 株相似性分别为 48.0%~48.1%、79.1%~79.3%、90.1%~90.2%, 与国内已发表的 PRRSV 其它毒株的相似性在 78.9%~98.9%和 79.0%~98.7%之间。

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Divergence	1	99.0	99.4	99.1	99.9	55.5	97.9	98.0	99.1	99.5	87.5	87.4	94.1	1	GD-2007.seq
	2	1.0	99.2	99.3	99.1	55.5	97.6	97.7	99.3	98.7	87.6	87.5	94.2	2	HEB1-2007.seq
	3	0.6	0.8	99.3	99.0	55.5	98.1	98.2	99.2	98.6	87.6	87.5	94.1	3	HUB2-2007.seq
	4	0.9	0.7	0.7	99.6	55.5	98.5	98.6	99.6	99.0	87.7	87.5	94.3	4	HUN4-2007.seq
	5	1.1	0.9	1.0	0.4	55.5	98.7	98.9	99.4	98.8	87.6	87.4	94.1	5	JXA1-2007.seq
	6	68.4	68.3	68.4	68.4	68.4	48.1	48.0	55.4	55.3	56.0	55.9	55.3	6	LV-2000.seq
	7	2.2	2.4	1.9	1.5	1.3	92.7	99.1	98.1	98.6	79.3	79.0	90.2	7	PRRSV-GDAb-f40.seq
	8	2.0	2.3	1.8	1.4	1.1	93.0	0.9	98.2	98.6	79.1	78.9	90.1	8	PRRSV-GD-f40.seq
	9	0.9	0.7	0.8	0.4	0.6	88.5	1.9	1.8	99.0	87.7	87.5	94.3	9	TJ-2008.seq
	10	1.5	1.3	1.4	1.0	1.2	68.9	1.4	1.4	1.0	87.6	87.4	93.8	10	YD-2011.seq
	11	14.1	13.9	14.0	13.9	14.0	67.0	25.7	25.8	13.9	14.0	99.7	89.9	11	ATCC VR-2332-2011.seq
	12	14.2	14.1	14.1	14.0	14.2	67.3	26.2	26.3	14.0	14.1	0.3	99.8	12	BJ-4-2001.seq
	13	6.3	6.2	6.2	6.0	6.3	68.0	10.8	10.9	6.0	6.5	11.1	11.3	13	CH-1a-2001.seq
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	

图3 Nsp2 核苷酸相似性比较结果

利用 MegAlign 绘制 Nsp2 遗传进化树, 结果表明(图4), PRRSV 美洲型与欧洲型是 2 个完全独立的基因型, 在美洲型 PRRSV 组成的分支中, 存在 2 个主要的分支: PRRSV-GD-f40 和 PRRSV-GDAb-f40 亲缘关系最近, 与 CH-1a 在同一分支中。

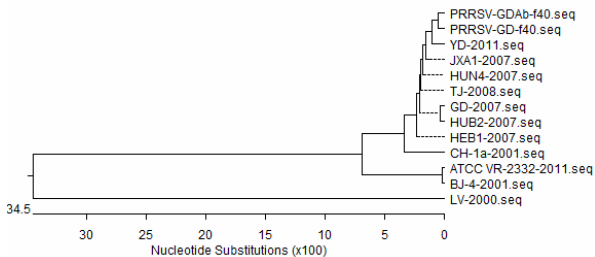


图4 Nsp2 序列遗传进化树

2.3.2 GP5 基因序列分析 对 PRRSV-GDAb-f40 GP5 进行序列测定, GP5 基因大小为 603 bp, 由其推导的氨基酸数为 200 个, 应用 MegAlign 对此毒

株和已经发表的 PRRSV GP5 进行相似性分析, 结果表明(图5), PRRSV-GD-f40、PRRSV-GDAb-f40 GP5 与母源株的相似性分别为 99.2%和 98.8%, 与欧洲型毒株 LV-2000 的相似性分别为 64.3%和 64.0%, 与美洲代表株 ATCC VR-2332 的相似性分别为 89.2%和 89.1%, 而与国内其它毒株的相似性分别在 88.4%~99.3%和 88.2%~99.0%之间。

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Divergence	1	64.0	98.8	99.2	99.7	99.0	89.2	88.4	95.4	92.7	99.5	99.5	99.8	1	JXA1-2007.seq	
	2	49.9	64.0	64.3	64.1	63.8	64.5	64.5	64.6	64.0	64.5	64.0	64.1	2	LV-2000.seq	
	3	1.2	49.9	98.7	98.8	98.2	89.1	88.2	94.9	98.8	98.7	98.7	99.0	3	PRRSV-GDAb-f40.seq	
	4	0.8	49.2	1.3	98.7	98.2	98.5	89.2	88.4	94.9	99.2	99.0	99.0	99.3	4	PRRSV-GD-f40.seq
	5	0.3	49.6	1.2	0.8	98.7	98.4	88.6	88.6	95.5	99.7	99.5	99.5	99.8	5	TJ-2008.seq
	6	1.0	50.2	1.0	1.5	1.3	88.6	87.7	94.4	98.7	98.5	98.5	98.0	6	YD-2011.seq	
	7	11.8	49.1	12.0	11.8	11.6	12.6	99.2	92.0	89.2	89.1	89.1	89.1	89.4	7	ATCC VR-2332-2011.seq
	8	12.8	49.1	13.0	12.8	12.6	13.6	0.8	91.2	88.4	88.2	88.2	88.6	8	BJ-4-2001.seq	
	9	4.8	48.7	5.4	5.4	4.6	5.9	8.5	9.5	95.4	95.2	95.2	95.5	9	CH-1a-2001.seq	
	10	0.3	49.9	1.2	0.8	0.3	1.3	11.8	12.8	4.8	99.5	99.5	99.8	10	GD-2007.seq	
	11	0.5	48.9	1.3	1.0	0.5	1.5	12.0	13.0	5.0	0.5	99.3	99.7	11	HEB1-2007.seq	
	12	0.5	49.9	1.3	1.0	0.5	1.5	12.0	13.0	5.0	0.5	0.7	99.7	12	HUB2-2007.seq	
	13	0.2	49.6	1.0	0.7	0.2	1.2	11.6	12.6	4.6	0.2	0.3	0.3	13	HUN4-2007.seq	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

图5 ORF5 核苷酸相似性比较结果

在分析毒株 GP5 基因序列相似性的基础上绘制遗传进化树(图6)。从图中可以看出, PRRSV-GD-f40、与 JXA1-2007 株、YD-2011 株亲缘关系较 PRRSV-GDAb-f40 近, 二者与 BJ-4-2010 株、ATCC VR-2332-2011 株关系都较远。

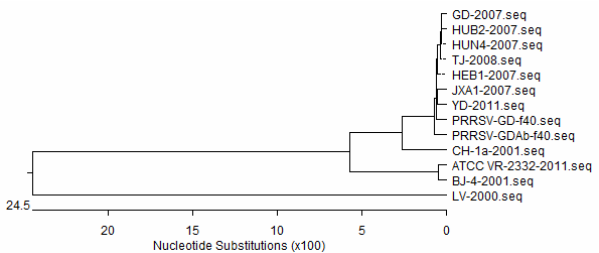


图6 GP5 序列遗传进化树

3 讨论

中国自 1996 年报道分离到 PRRSV 之后, 随后在我国蔓延开来, 2006 年我国爆发的“高热病”就与此病毒有关, 病毒分离分析结果显示, Nsp2 有不连续 30 个氨基酸缺失。有资料表明, PRRSV 存在碱基突变、缺失、基因重组等方式变异, 可以说 PRRSV 核苷酸序列的变异是造成本病难以控制的重要原因之一[9-10]。PRRSV 基因组中, 非结构蛋白中 ORF1a 编码的 Nsp2 氨基酸变异程度最高, 结构蛋白中 GP5 (E 蛋白) 编码病毒的囊膜糖蛋白最容易发生变异, 近年来诸多学者把 Nsp2 编码基因和 GP5 基因作为主要研究对象。本实验中模拟 PRRSV 在猪体内的生存环境, 在抗体压力下传代后分析 Nsp2 和 GP5 变异情况, 以此来判断长期使用疫苗对 PRRSV

(下转第 37 页)

猪高致病性蓝耳病弱毒活疫苗免疫试验

冯开容¹, 钱慧慧¹, 陆巧芬¹, 曹建伟¹, 林长沾², 谭文盛², 胡启传¹, 冯秀红¹,
李瑞亭¹, 陈修邓¹, 谢东¹, 关建新*

(1. 江门市动物疫病预防控制中心, 广东 江门 529000; 2. 江门市江海区动物疫病预防控制中心,
广东 江门 529000)

摘要:为了更好地指导养殖户应用高致病性蓝耳病活疫苗(JXA1-R株),本中心从淋巴细胞计数、病毒核酸检测、免疫抗体检测等方面,分析了高致病性蓝耳病弱毒活疫苗免疫应答情况。本次试验选取30天龄的杜长大三元断奶仔猪20头,随机分成A、B两组,每组10头。A组注射JXA1-R株活疫苗,B组头注射生理盐水作对照。结果显示该疫苗免疫仔猪28天后,淋巴细胞由 $7.585 \times 10^9/L$ 上升到 $15.28 \times 10^9/L$,免疫抗体阳性率由0%上升到100%,免疫猪病毒核酸检出率由0%上升到90%。揭示了PRRS活疫苗(JXA1-R株)能使仔猪产生较好的免疫应答,疫苗病毒感染持续时间多数超过28天。

关键词: PRRS JXA1-R株; 活疫苗; 免疫应答

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0032-03

The Vaccination Results of Attenuated Live Vaccine of Highly Pathogenic PRRS

Feng Kairong¹, Qian Huihui¹, Lu Qiaofen¹, Cao Jianwei¹, Lin Changzhan², Tan Wensheng², Hu Qichuan¹, Feng Xiuhong¹, Li Ruiting¹, Chen Xiudeng¹, Xie Dong¹, Guan Jianxin*

(1. Jiangmen Animal Disease Prevention and Control Center, Jiangmen 529020, China; 2. Jiangmen Jianghai District Animal Disease Prevention and Control Center, Jiangmen 529020, China)

Abstract: Lymphocytes, virus nucleic acid and immune antibody were detected in our lab on analyzing immune response against attenuated live vaccine on highly pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) for guiding applications of this vaccine by farmers betterly. Twenty 30-day-old ternary weaned piglets were randomly divided into two groups A and B. The pigs in Group A were injected with live vaccine and the pigs in group B were injected with saline solution as control. The results showed that the Lymphocytes increased from $7.585 \times 10^9/L$ to $15.28 \times 10^9/L$, the antibody-positive rate increased from 0% to 100%, virus nucleic acid positive rate increased from 0% to 90% in vaccinated piglets after 28 days. The results showed that the live vaccine(JXA1-R strain) of PRRS could induce better immune response in pigs and the duration time of vaccine virus infection were more than 28 days.

Key words: PRRS JXA1-R strains; Live vaccine; Lymphocytes

猪繁殖与呼吸障碍综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)俗称猪蓝耳病,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的急性传染病^[1]。目前针对该病尚无有效的治疗方法,疫苗免疫仍然是主要防控途径之一^[1-2]。高致病性蓝耳病(PRRS)活疫苗(JXA1-R株)由中国动物疫病控制中心等单位研制成功,并应用于生产实

践中。为了更好地指导养殖户应用高致病性蓝耳病活疫苗,江门市动物疫病预防控制中心于2009-2010年进行了猪高致病性蓝耳病弱毒活疫苗应用效果的观察试验。

1 实验材料

1.1 实验动物

30天龄的杜长大三元杂断奶仔猪20头,由江

门市某猪场提供, 试验前均未接种过高致病性蓝耳病 (PRRS) 疫苗, 健康状况良好, 群体差异性小。

1.2 主要仪器

Eppendorf realplex2 荧光 PCR 仪、普朗 XF9080 血液分析仪、BioTek-ELX800 酶标仪、SiG-MA-3K15 高速冷冻离心机、Labconco-A2 II 级生物安全柜。

1.3 主要试剂与耗材

高致病性蓝耳病 (PRRS) 活疫苗 (JXA1-R 株), 疫苗批号 0912013, 稀释液批号 091005, 由某动物保健品股份有限公司生产; PG BIOTECH (深圳匹基) 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (变异株) 荧光定量检测试剂盒; 法国 LSI 猪蓝耳病 ELISA 试剂盒。

2 实验方法

2.1 动物分组

实验用 30 天龄的断奶仔猪共 20 头, 随机抽选 10 头作空白对照组 (B 组), 另 10 头作免疫试验组 (A 组)。A 组 10 头仔猪免疫前、免疫后 14 天、28 天, 每头猪分别采集抗凝血和非抗凝血各 1 份; 空白对照组注射生理盐水, 在试验组相应时间也每头猪采集抗凝血和非抗凝血各 1 份。记录猪只免疫后发病率及体温变化等临床症状。

2.2 白细胞测量

2.2.1 采血与抗凝 用前腔静脉采血方式, 用 EDTA-K2 抗凝剂。采血前 EDTA-K2 配成 15% 的水溶液, 按每 mL 血液中加入 1.2 mg EDTA, 即每 5 mL 血液加 15% EDTA 溶液 0.04 mL 的量加于新鲜血液中。

2.2.2 细胞检测 按照普朗 XF9080 血液分析仪的操作说明进行白细胞检测。

2.3 病毒检测

2.3.1 血液样品的制备 取非抗凝血样本放进离心机, 6 000 rpm 离心 1 min, 取上清装入 1.5 mL 经灭菌的无 RNA 酶管中备用。

2.3.2 检测 按照 PG BIOTECH (深圳匹基) 猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光定量检测试剂盒的说明进行病毒检测。

2.3.3 仪器通道选择 荧光信号收集时设定为报告基团 FAM, 荧光发射波长 520 nm。

2.3.4 质控 阴性对照没有 Ct 值应为 none; 阳性对照 Ct 值应小于 28。否则视为无效。结果判定: 样品 Ct 值小于 30, 且曲线有明显的指数增长

期, 判为阳性。Ct 值大于 30, 重复做一次, 如果检测 Ct 值为 none, 报告样本阴性, 否则可判为阳性。对于某些样本未呈现 S 型曲线, 但本底较高的样本, 应为阴性。

2.4 抗体水平检测

2.4.1 样品的准备 将被检血清样品用样品稀释液作 1:200 稀释。对照血清不作稀释。确保每个样品都换枪头, 做好样品的标记。

2.4.2 样品检测 按照法国 LSI 猪蓝耳病 ELISA 试剂盒说明进行抗体检测。结果判定: 阳性对照 OD₄₅₀ 平均值 ≥ 0.6 ; 阳性对照平均值 / 阴性对照平均值符合 $PC_x/NC_x \geq 4.0$ 的标准, 则判定本次试验结果有效。PRRSV 抗体的存在与否, 通过计算样品对阳性的 IRPC 值来决定。如果 IRPC 值 ≤ 20 , 样品判为 PRRS 抗体阴性。如果 IRPC 值 > 20 , 样品判为 PRRS 抗体阳性。

3 结果

3.1 淋巴细胞数计数

结果显示免疫组在免疫 14 天后淋巴细胞数增加不明显, 28 天后淋巴细胞数上升明显, 与空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。图 1 为淋巴细胞数变化图, 说明 A 组有较好的免疫应答。

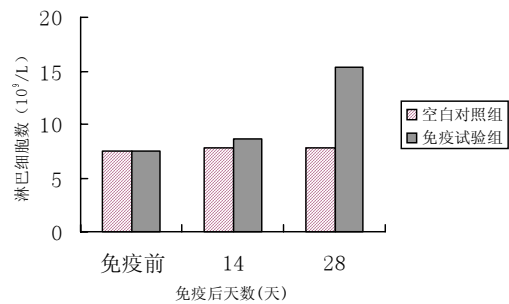


图 1 淋巴细胞数变化

3.2 病毒检测

本次试验荧光 PCR 检测结果如图 2、图 3。图 2 所示, 免疫前猪繁殖与呼吸综合征病毒 (变异株) 核酸荧光 PCR 检测, A、B 组血清样品 Ct 值均为 none; 图 3 所示, 免疫后 28 天猪繁殖与呼吸综合征病毒 (变异株) 核酸荧光 PCR 检测, A 组 9 份血清样品 Ct 值小于 30, B 组血清样品 Ct 值均为 none。说明所有试验动物试验前未检出猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸; A 组免疫后 28 天病毒核酸阳性率 90% (9/10), B 组免疫后 28 天病毒核酸阳性率 0% (0/10)。

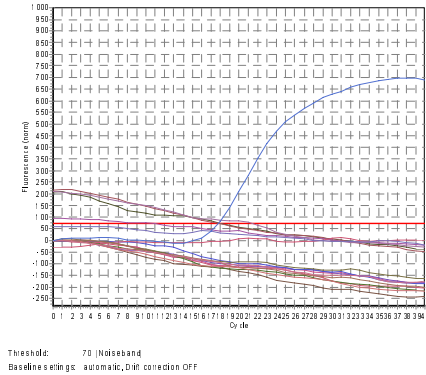


图2 A、B组免疫前荧光PCR检测曲线

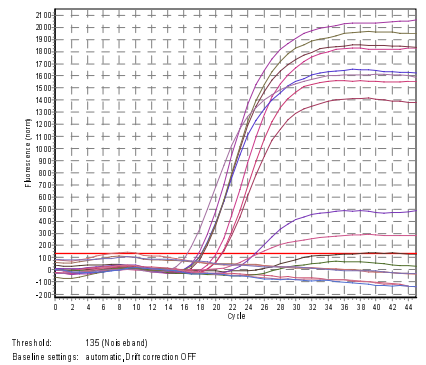


图3 A、B组免疫后28天荧光PCR检测曲线

3.3 抗体水平检测

免疫前后各组的抗体水平如表1和表2所示,说明免疫后试验组均产生抗体。

表1 试验组抗体检测结果

项目	免疫时间		
	免疫前	免疫后14天	免疫后28天
数量(头)	10	10	10
阳性数(份)	0	4	10
阳性率(%)	0	40	100

表2 对照组抗体检测结果

项目	免疫时间		
	免疫前	免疫后14天	免疫后28天
数量(头)	10	10	10
阳性数(份)	0	0	0
阳性率(%)	0	0	0

3.4 不良反应

试验组A组10头免疫仔猪,基本上未出现大的不良反应,仅其中仔猪2头在免疫后第三天体

温超过正常体温0.5~1℃;1头仔猪免疫后第二天出现轻度腹泻现象,第四天恢复正常。

4 分析与讨论

4.1 淋巴细胞增殖应答

本次试验显示,30天龄10头断奶仔猪免疫高致病性蓝耳弱毒疫苗后,外周血液28天内淋巴细胞增加。根据免疫应答的规律,虽然免疫应答是一个连续的不可分割的过程,但可人为地划分为三个阶段:致敏阶段、反应阶段、效应阶段。反应阶段又称增殖与分化阶段。此阶段是抗原特异性淋巴细胞识别抗原后活化,进行增殖与分化,以及产生效应性淋巴细胞和效应分子的过程^[3]。据此分析本次试验空白对照组和免疫试验组的结果,可初步判断猪注射高致病性蓝耳病弱毒疫苗后,发生淋巴细胞增殖应答过程。

4.2 免疫抗体产生

对免疫后28天的血清进行抗体检测,阳性率达100%,同样说明了免疫应答的存在。结果与陈瑞爱等的试验相似,陈瑞爱等研究指出,使用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)对猪进行免疫后,7d即有抗体产生,免疫28d后抗体阳性率为5/5。用1mL PRRSV, NVDC-JXA1株F5代原倍病毒液攻毒仍可达4/5以上的保护^[4]。可见,免疫该疫苗确实可刺激机体产生特异性抗体。

4.3 疫苗毒持续时间

免疫后28天病毒核酸阳性率90%(9/10),说明免疫后疫苗毒持续时间多数超过28d,但不超过50d^[5],疫苗免疫总体是安全的。高致病性猪蓝耳病活疫苗可以在蓝耳病阳性地区的猪场使用,而对于阴性场应慎重考虑。

参考文献:

- [1] 甘孟侯, 杨汉春. 中国猪病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 183-184.
- [2] 梁皓仪. 不同蓝耳病疫苗的免疫效果-抗体效价分析[J]. 养猪, 2008(4): 70-72.
- [3] 杨汉春. 动物免疫学[M]. 第二版. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 111.
- [4] 陈瑞爱, 裴仇福, 罗满林, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗的免疫效果观察评论[J]. 中国动物保健, 2009(7): 83-86.
- [5] 任裕其, 孙彦伟, 查云峰, 等. 四个不同厂家高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)的免疫效果比较试验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(3): 36-38.

乳酸锌对蛋鸡生产性能及蛋壳质量的影响试验

赵必迁¹, 周安国², 李学海³

(1. 雅安市农业局, 四川 雅安 625000; 2. 四川农业大学动物营养研究所, 四川 雅安 625014;
3. 攀枝花市行远牧业有限公司, 四川 攀枝花 617061)

摘要: 本试验旨在研究乳酸锌对蛋鸡生产性能及蛋壳质量的影响。试验采用单因子随机分组试验设计, 选取1 600只360日龄的罗曼粉壳蛋鸡, 随机分到4个处理组, 各处理组8个重复, 每个重复50只鸡。基础饲料采用为玉米-豆粕型粉状饲料, 处理1饲喂基础饲料+60 mg/kg 一水硫酸锌(以锌计); 处理2饲喂基础饲料+60 mg/kg 乳酸锌(以锌计); 处理3饲喂基础饲料+40 mg/kg 乳酸锌(以锌计); 处理4饲喂基础饲料+60 mg/kg 锌(一水硫酸锌和乳酸锌提供的锌各一半)。试验结果表明, 在产蛋鸡饲料中乳酸锌(60 mg/kg)等量替代一水硫酸锌, 能显著降低平均破蛋率, 提高平均蛋壳强度和平均蛋壳厚度($P < 0.05$); 对蛋鸡的平均产蛋率、平均蛋重、平均日采食量和平均料蛋比无显著影响。

关键词: 乳酸锌; 蛋鸡; 生产性能; 蛋壳质量

中图分类号: S816.72

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0035-03

Effects of Zinc Lactate on the Production Performance and Eggshell Quality in Laying Hens

Zhang Biqian¹, Zhou Anguo², Li Xuehai³

(1. Agriculture Bureau of Ya'an, Ya'an 625000, China; 2. Animal Nutrition Institute of Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China; 3. Xingyuan Animal Husbandry Limited Liability Company of Pan Zhi Hua, Panzhihua 617061, China)

Abstract: The objective of the present study was to investigate the effects of zinc lactate on the production performance and eggshell quality of laying hens. A single factorial randomized experimental design was adopted. 1600 360-day Roman pink shell layers were randomly assigned to 4 treatments based on body weight with 8 replicate cages of 50 laying hens in each. The basal diet was the corn-soybean meal diet. Treatment 1 was supplemented with Zinc sulfate monohydrate in the basal diet at 60mg/kg (Zinc basis), treatment 2 was supplemented with Zinc lactate in the basal diet at 60mg/kg (Zinc basis), treatment 3 was supplemented with Zinc lactate in the basal diet at 40 mg/kg (Zinc basis) and treatment 4 was supplemented with Zinc in the basal diet at 60mg/kg (the half Zinc of Zinc sulfate monohydrate and Zinc lactate). The results showed that substitution Zinc lactate for zinc sulfate in the diet of laying hens could reduce the average broken egg rate and increase the average eggshell strength and the average eggshell thickness significantly ($P < 0.05$) and it did not affect the average egg laying rate, the average egg weight, average daily feed intake and average feed-egg ratio significantly ($P > 0.05$).

Key words: Zinc lactate; Laying hens; Production performance; Eggshell quality

锌(zinc)是动物机体必需微量元素之一,对动物的生长发育、生产性能、繁殖和免疫功能等方面均有着重要的影响。乳酸锌属于有机酸-微量元素配合物,是一种新型的有机锌添加剂。在蛋鸡业中,乳酸锌对产蛋鸡应用研究较少。所以有必要开展乳酸锌对蛋鸡生产性能和蛋壳质量影响的研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

锌源:乳酸锌由四川畜科饲料有限公司提供,乳酸锌 $\geq 98.0\%$,锌 $\geq 21.5\%$;一水硫酸锌由成都蜀

星饲料有限公司提供,锌 $\geq 34.5\%$ 。试验动物:360日龄罗曼粉壳产蛋鸡1 600只,粉壳蛋鸡苗购自四川圣迪乐村禽业发展有限公司,由攀枝花市行远牧业有限公司进行育雏育成和产蛋管理。

1.2 试验设计

选取360日龄健康、生产性能相近的罗曼粉壳蛋鸡1 600只,随机分为4组,每组8个重复,每个重复50只。采用单因子随机区组试验设计(表1)。

1.3 基础饲料

饲料配制参照NRC(1994)中的蛋鸡饲养标准

和中国 NY/T33-2004 中的蛋鸡饲养标准结合生产实际情况, 采用玉米-豆粕型饲料, 粉料。基础饲料组成和营养水平见表 2, 微量矿物元素预混剂中不提供锌元素。

表 1 试验设计

处理	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4
一水硫酸锌(以锌计, mg/kg)	60	0	0	30
乳酸锌(以锌计, mg/kg)	0	60	40	30

表 2 蛋鸡产蛋期基础饲料组成及营养水平

饲料原料(%)	比例(%)	营养水平 ³⁾	营养指标(%)
玉米	60.800	粗蛋白	16.5
豆粕(CP≥43%)	21.900	代谢能(MCal/kg)	2.65
菜籽饼	2.500	总赖氨酸	0.82
棉籽粕(CP≥41%)	3.000	总蛋氨酸	0.35
菜籽油	0.700	总含硫氨基酸	0.63
蛋氨酸	0.100	苏氨酸	0.63
钙粒	8.100	色氨酸	0.19
钙粉	1.000	钙	3.6
磷酸氢钙	1.150	总磷	0.5
食盐	0.280	有效磷	0.33
小苏打	0.100	锌(mg/kg)	34.5
微量矿物元素预混剂 ¹⁾	0.200		
多维预混剂 ²⁾	0.040		
黄色素(胡萝卜阿卜酯≥10%)	0.004		
红色素(斑蝥黄≥10%)	0.002		
氯化胆碱(50%)	0.120		

1): 每千克饲料含维生素 A 12000IU、维生素 D 3200IU、维生素 E 20IU、维生素 K 32.4mg、维生素 B₁ 1.2mg、维生素 B₂ 4.8mg、维生素 B₆ 3.2mg、维生素 B₁₂ 20 μg、叶酸 800 μg、烟酸 32mg、泛酸钙 10mg。
2) 微量矿物元素预混剂折算到每千克饲料为铁 80mg、铜 10mg、锰 60mg、硒 0.3mg、碘 0.4mg、无锌元素; 3) 营养水平为理论计算值。

1.4 饲养管理

试验于 2011 年 8 月 2 日到 2011 年 11 月 4 日在攀枝花市行远牧业公司蛋鸡场进行。预试期 1 周, 试验期 12 周, 每笼饲养 5 只鸡, 自由采食和饮水, 鸡舍温湿度自动控制, 温度稳定在 21~23℃, 湿度稳定在 55%~65%。饲养按常规饲养程序、消毒卫生、免疫程序进行。

1.5 指标的测定

试验期间每天记录产蛋率、破蛋率、蛋重、采食量及死亡数。试验结束累计计算各处理组的平均产蛋率、平均蛋重、平均日采食量、平均料重比、平均死亡率。试验结束每个重复随机采集 2 枚蛋用蛋壳强度测定仪测定蛋壳强度。用螺旋测微器测量蛋壳的钝端、中部、锐端 3 处厚度, 取其平均值为蛋壳厚度。

1.6 数据统计处理

试验数据用 excel 2003 进行数据整理。采用

SPPS13.0 的 One-way ANOVA 进行方差分析, 结合 Duncan 法进行多重比较。所有数据以平均数±标准差表示。

2 试验结果

乳酸锌对产蛋鸡生产性能的影响见表 3。处理组间蛋鸡的平均产蛋率、平均蛋重、平均日采食量、平均料蛋比差异不显著 ($P>0.05$)。平均死亡率以处理 2 最低, 处理 1 最高, 但差异不显著。

乳酸锌对鸡蛋壳品质的影响见表 4。平均破蛋率以处理 1 最高, 处理 2 最低; 处理 2 分别比处理 1、3 降低了 35.9% 和 26.5%, 差异显著 ($P<0.05$)。蛋壳平均强度以处理 2 最大, 分别比处理 1、3、4 提高了 11.8%、12.4% 和 6.0%, 且差异显著 ($P<0.05$); 蛋壳平均厚度以处理 2 最厚, 处理 1 最薄, 但是处理组间差异未达到显著水平 ($P>0.05$)。

3 讨论

本试验表明以一水硫酸锌和乳酸锌两种不同锌源添加到产蛋鸡饲料中, 对产蛋率、蛋重、日采食量和料蛋比无显著影响, 与高峰^[1]应用蛋氨酸锌的试验结果相类似, 与邝声耀等^[2]在断奶仔猪和白国勇等^[3]在法系獭兔上添加乳酸锌与硫酸锌相比都提高生产性能的试验结果不一致。James 和 Milton 认为, 饲料中锌含量 28 mg/kg 即可满足母鸡产卵、受精、孵化及雏鸡生长的需要, 根据前人的试验结果可初步认为, 以传统方法评定蛋鸡对锌的需要量为 30~50 mg/kg^[4]。本试验结果可能与试验饲料原料中锌理论含量为 34.5 mg/kg 能基本满足蛋鸡需求有关。

本试验表明添加乳酸锌能减少平均破蛋率、提高蛋壳平均厚度, 且添加 60 mg/kg 乳酸锌能显著降低破蛋率, 显著提高蛋壳强度和厚度, 改善鸡蛋品质, 与张世栋^[5]在蛋鸡饲料中添加蛋氨酸锌比添加硫酸锌组(两组日粮含锌量相同)显著改善蛋壳品质的试验结果一致。杨人奇等^[6]试验发现, 在产蛋鸡饲料中添加 40 mg/kg 锌就可改善蛋壳质量, 且随饲料中锌水平的增加破壳率下降, 蛋壳强度、蛋壳厚度升高。研究认为蛋壳在蛋壳腺形成时, 蛋壳腺应有足够的钙和碳酸根离子, 以形成蛋壳, 以锌为辅基成分的碳酸酐酶在提供碳酸根离子中起重要作用^[7]。杨生奎等^[8]认为, 乳酸锌的分子量较小, 电离程度较高, 易与肠内的配位体或金属载体结合, 也易通过细胞膜进入细胞, 因而乳酸锌的相对生物利用率高。所以本试验添加乳酸锌改善蛋壳品质, 可能与乳酸锌的高相对生物利用率, 使得在蛋壳形

表 3 乳酸锌对产蛋鸡生产性能的影响

处理组	平均产蛋率(%)	平均蛋重(g)	平均日采食量(g)	平均料蛋比	平均死亡率(%)
1	86.2±2.6	62.8±1.1	114.8±2.7	2.12±0.06	0.89
2	87.6±2.7	62.5±1.3	113.4±1.1	2.07±0.08	0.36
3	86.5±3.2	62.6±1.6	113.7±1.6	2.10±0.04	0.64
4	87.9±3.7	63.2±1.7	114.2±2.1	2.06±0.05	0.53

表 4 乳酸锌对蛋壳品质的影响

处理组	平均破蛋率(%)	平均强度(kg/cm)	平均厚度(μm)
1	0.87±0.15 ^{a1)}	3.34±0.17 ^a	354.6±24.3
2	0.64±0.12 ^b	3.79±0.29 ^b	376.5±28.8
3	0.81±0.13 ^a	3.32±0.32 ^a	360.3±26.7
4	0.77±0.14 ^{ab}	3.56±0.38 ^{ab}	368.9±20.5

1): 进行列比较, 同列中标不同小写字母表示差异显著(P<0.05), 标不同的大写字母表示差异极显著(P<0.01)。

成过程中提高了以锌作为辅基成分的碳酸酐酶量和酶活性有关。具体作用机理还需进一步研究。

4 结论

本试验结果表明, 60 mg/kg 乳酸锌等量替代一水硫酸锌, 能显著降低平均破蛋率、提高平均蛋壳强度和平均蛋壳厚度, 降低死亡率效果; 对蛋鸡的平均产蛋率、平均蛋重、平均日采食量和平均料蛋比无显著影响。

参考文献:

[1] 高峰, 江芸, 苏勇. 不同锌源对蛋鸡产蛋性能和蛋品质的影响[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(1): 30-35.
 [2] 邝声耀, 唐凌, 张纯. 有机锌在动物营养中的研究与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2006(7): 23-25.
 [3] 白国勇, 邝声耀, 程森林. 乳酸锌对獭兔生产性能的影响[J]. 四川畜牧兽医, 2009(10): 27-29.
 [4] 周利梅. 微量元素锌在动物营养中的作用研究进展[J]. 畜禽业, 2000(10): 12-14.
 [5] 张世栋, 肖发沂. 添加蛋氨酸锌对高温下产蛋鸡蛋壳质量的影响[J]. 中国饲料, 1998(19): 12-13.
 [6] 杨人奇, 冯于明. 氨基酸锌应用于产蛋鸡的效果研究[J]. 中国饲料, 2003(5): 17-18.
 [7] 吕景旭, 穆新之, 王孝峰. 蛋壳质量与锌锰的利用[J]. 饲料工业, 1998(8): 22-23.
 [8] 杨生奎, 程义勇. 乳酸锌和葡萄糖酸锌的生物利用率比较[J]. 营养学报, 1994, 16(1): 51-55.

(上接第 31 页)

变异的影响。分析显示, RRRSV-GDAb-f40 株与母源毒株的相似性, Nsp2 为 97.9%, GP5 为 98.8%, 说明在抗体压力下, PRRSV 发生了变异, 通过观察还可以看出 Nsp2 自然传代和抗体压力下传代变异率相似, 猜测可能和选取的部分序列的保守性有关。由于猪繁殖与呼吸综合征病因十分复杂, 是否存在环境压力对毒株变异的影响, 还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Collin J E, Benfield D A, Christianson W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pig[J]. J Vet Diagn Inverst. 1992(4): 117-126.
 [2] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRSV 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1996, 18(2): 1-4.
 [3] GaoZhiqiang, GuoXin, Yang Hanchun, et al. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Arch Virol, 2004, 149(7): 1341-1351.
 [4] Allende R, Lewis T L, Lu Z, et al. North America and

European porcine reproductive and respiratory syndrome virus differ nonstructural protein coding regions[J]. J Gen Virol, 1999, 80(Pt2): 307-315.
 [5] Mateu E, Diaz I, Darwich L, et al. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005[J]. Virus Res, 2006, 115: 198-206.
 [6] Han J, Wang Y, Taaberg K S, et al. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virus Res, 2006, 122(1/2): 175-182
 [7] 尹国友, 吴发兴, 郭爱英, 等. 辽宁省部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒流行株 ORF5-7 基因遗传变异分析[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(3): 27
 [8] 赵鹏, 马诚太, 崔治中, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒在抗体免疫选择压下的变异[J]. 中国科学, 2010, 40(10): 952-962.
 [9] Goldberg TL, Hahn EC, Weigel RM, et al. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois [J]. J Gen Virol, 2000, 81: 171-179.
 [10] Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current-vaccine efficacy and future vaccine development [J]. Vet Microbiol. 2000, 74(4): 309-329.

芪芍增免散对鸡法氏囊病疫苗免疫增强作用的研究

刘建伟, 郭莉, 刘佳

(保定市冀农动物药业有限公司, 河北 保定 071100)

摘要: 将520只7日龄海兰灰蛋鸡雏随机分成4组, 分别设为3个剂量组(0.5%组、1.0%组和1.5%组)和一个空白对照组, 给药组分别于14日龄常规剂量滴鼻点眼免疫法必妥(鸡传染性法氏囊病中等毒力活疫苗), 28日龄2倍剂量饮水法必妥。通过测定法氏囊病抗体水平、脾指数、法氏囊指数、外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值和外周血白细胞总数等指标, 研究芪芍增免散对鸡法氏囊病疫苗免疫增强的影响。结果显示: 芪芍增免散能够明显延长法氏囊病抗体持续时间, 提高脾指数、法氏囊指数、外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值和外周血白细胞总数。推荐芪芍增免散1.0%组为临床推荐剂量。

关键词: 鸡传染性法氏囊病; 抗体效价; 效果

中图分类号: S853.76

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0038-04

Effect of Qishaozengmiansan on the Immunological Enhancement of IBD Vaccine in Chickens

Liu Jianwei, Guo Li, Liu Jia

(Jinong Animal Pharmaceutical Co.Ltd., Baoding 071100,China)

Abstract: 520 7-day-old Hy gray eggs chickens were randomly divided into four groups including three experiment groups (0.5% groups, 1.0% groups, 1.5%groups) and a control group. The chickens were immunized with Fabitux (IBD moderate virulence live vaccine) by the method of intranasal immunization and eye-drop vaccination at 14-day-old and were vaccinated through water again at 28-day-old. The effect of Qishaozengmiansan on the immunological enhancement of IBD vaccine were determined by detection of the antibody levels against IBD, spleen index, acidic - naphthyl acetate esterase (ANAE) in peripheral blood lymphocytes and the leukocyte in peripheral blood. The results showed that Qishaozengmiansan could significantly prolong the bursal antibody persistence time, increase the spleen index, bursal index, ANAE's value and the leukocyte.count. So1% Qishaozengmiansan was recommended for clinical application.

Key words: Infectious bursal disease; Antibody titer; Effect

芪芍增免散是保定市某动物药业公司自主研发的三类新中兽药。它是由黄芪、白芍、麦冬、淫羊藿等四味中草药根据传统中医组方理论, 按照一定比例配伍而成的新型纯中药复方免疫增强剂。中兽医理论认为, 畜禽机体免疫力降低, 抵抗力下降主要是由于机体气血阴阳不足导致机体产生虚证所致。中兽医提出了“虚则补之”的治疗原则, 故治疗虚证宜采用补法, 或补气, 或补血, 或气血双补; 或滋阴, 或助阳, 或阴阳并济。但在畜禽生命活

动中, 气、血、阴、阳是密切联系的, 同时在兽医临床上又往往数证兼见, 因此, 补气药、补血药、滋阴药、助阳药常常相互配伍应用^[1-3]。该药选择了不同的补气药、补血药、滋阴药和助阳药进行组方并进行了处方筛选试验, 最终确定了补气药黄芪、补血药白芍、滋阴药麦冬、助阳药淫羊藿为组方药材。为了全面评价本散剂在临床上的确切功效, 研究家禽应用该散剂配合疫苗免疫后机体的抗体效价水平变化、免疫器官指数、外周血液酸性-醋酸

萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值和外周血白细胞总数的变化,并通过统计学分析来综合评价芪芍增免散对目标适应症动物(鸡)的有效性和安全性,推荐临床给药剂量,为此我们进行了本次试验。

1 试验地点

本次试验试验鸡饲养于河北农业大学畜牧教学基地小动物舍,各项指标参数的测定于河北农业大学动物科技学院临床兽医实验室完成,各项数据的采集和试验结果的分析于临床兽医实验室完成。

2 试验材料与方法

2.1 试验药品

芪芍增免散,保定市某动物药业公司生产,规格 200g/袋,产品批号:2012042201。

法必妥(鸡传染性法氏囊病中等毒力活疫苗),瑞普(保定)生物药业有限公司生产,产品批号 20111119。

2.2 试验动物、分组与处理

1日龄海兰灰蛋鸡雏(购于保定市樊庄种鸡厂),雌雄各半,饲养至7日龄,随机分组(见表1)。各组鸡只饲喂无抗生素的全价日粮(购于保定市方田饲料厂),自由采食和饮水,于14日龄常规剂量滴鼻点眼免疫法必妥(鸡传染性法氏囊病中等毒力活疫苗),28日龄2倍剂量饮水法必妥。

表1 试验分组与处理

组别	数量(只)	处理方式
芪芍增免散 0.5%组	130	于7日龄拌料饲喂,连用15 d。
芪芍增免散 1.0%组	130	于7日龄拌料饲喂,连用15 d。
芪芍增免散 1.5%组	130	于7日龄拌料饲喂,连用15 d。
对照组	130	免疫不给药

2.3 检测指标及测定方法

2.3.1 血清抗体水平的测定 分别于1日龄和7日龄从鸡群中随机选取20只采血制备血清,测定鸡群母源抗体水平。各组鸡于14日龄、21日龄、28日龄、35日龄、42日龄、49日龄和56日龄时随机选取15只采血(采血后淘汰),将血液分为2份,1份加抗凝剂,备用;1份制备血清,测定IBDV的抗体效价。抗体效价的测定,采用琼脂扩散沉淀反应法^[4]。

2.3.2 脾指数和法氏囊指数的测定^[5-7] 于14日龄、21日龄、28日龄、35日龄、42日龄、49日龄和56日龄将采血后淘汰的鸡只剖杀,取脾和法氏囊,剥离多余组织用滤纸吸水后称重,按下面公式

计算法氏囊指数和脾指数:

$$\text{法氏囊指数}(\text{mg/g}) = \text{法氏囊重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

$$\text{脾指数}(\text{mg/g}) = \text{脾重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.3.3 外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值的测定^[9,11]

2.3.3.1 试剂的配制 ①2.5%戊二醛固定液:在0.1 mol/L pH值7.4的磷酸缓冲液9 mL中加入2.5%戊二醛溶液1 mL,混合置4℃冰箱保存备用。②副品红溶液:将副品红4 g加入100 mL 2 mol/L 盐酸中,置37℃水浴中使其溶解,用滤纸过滤后,置4℃冰箱保存备用。③α-醋酸萘酯酶溶液:将α-醋酸萘酯酶2 g溶于100 mL 乙二醇单甲醚中,置4℃冰箱避光保存备用。④0.067 mol/L、pH7.6磷酸缓冲液:甲液:KH₂PO₄ 9.08 g,加蒸馏水至1 000 mL;乙液:NaHPO₄ 9.47 g,加蒸馏水至1 000 mL;在13 mL甲液中加入乙液87 mL,即为0.067 mol/L、pH 7.6磷酸缓冲液。⑤孔雀绿染色液:取孔雀绿1 g,加入预温至37℃的蒸馏水100 mL,溶解后置冰箱保存备用。⑥亚硝酸钠溶液:取亚硝酸钠0.2 g,溶于5 mL蒸馏水中,临用前配置。⑦六偶氮副品红液:取新配置的亚硝酸钠溶液3 mL,慢慢加入副品红溶液3 mL,边滴边摇,此时有刺激性气体产生,充分混合,1 min后备用。⑧反应液:取0.067 mol/L、pH 7.6磷酸缓冲液89 mL,倾入染色缸中,慢慢加入六偶氮副品红液6 mL,充分混合后,再慢慢滴入α-醋酸萘酯酶溶液2.5 mL,充分混匀,溶液呈均匀混浊,调pH至5.8~6.4,此反应液应在临用前配置。

2.3.3.2 操作方法 ①抗凝血离心处理:离心管中,加入淋巴细胞分层液1.5~2 mL,用吸管吸取抗凝血1 mL,沿管壁徐徐重叠于分层液上,2 000~3 000 r/m离心20 min。因各类细胞比重不同,离心后所在的位置也不相同。管底为粒细胞及红细胞,上层血浆另取小离心管加3~5 mL Hank's液,用胶头滴管吸取离心后的淋巴细胞层(离心后在血浆与分层液间形成乳白色细胞层),混合,1 000~1 500 r/m离心10 min,弃上清,轻振使细胞重悬,再加Hank's液离心洗涤,共3次,弃上清。②制片:用玻璃棒蘸取少量上述离心后所得的淋巴细胞,涂抹于载玻片上。涂片干燥后加1滴2.5%戊二醛,4℃固定10 min,流水充分冲洗,将玻片置于37℃预温30 min的反应液中,37℃孵育1~1.5 h,取出后以流水冲洗,吹干。将上述玻片吹干,滴加

1%孔雀绿复染 30 s,流水冲洗、吹干。③计数:10×40 倍显微镜下观察,计数。每份标本至少计数 200 个淋巴细胞,求 ANAE 的阳性率。

2.3.3.3 结果判断 用淋巴细胞分层液分离的淋巴细胞层中,必然混有少量的其他细胞,但图像各有特点:①T 淋巴细胞:ANAE 阳性,胞质内有大小不等,数量不一,界限分明的红黑色颗粒或斑块。整个细胞棕灰色或灰绿色。②单核细胞:ANAE 阳性,胞质内有弥散细小的棕褐色颗粒,多数为充盈整个细胞的棕褐色斑块。③B 淋巴细胞:ANAE 阴性,胞质内无明显着色颗粒。④血小板及幼粒细胞:细胞质内有弥散细小的红色颗粒。成熟粒细胞则呈阴性反应。

10×40 倍显微镜下记录 200 个淋巴细胞,分别记下 T、B 淋巴细胞数,计算 ANAE 淋巴细胞阳性百分率。

2.3.4 外周血白细胞总数的测定^[8,10]

2.3.4.1 白细胞计数液的配制 甲液:中性红 25 g,氯化钠 0.9 g,蒸馏水 100 mL;乙液:结晶紫 12 g,柠檬酸钠 3.8 g,甲醛(弱酸性)0.8 g;蒸馏水 100 mL,用前将甲液、乙液分别过滤并加热到 41~42 °C。

2.3.4.2 操作方法 ①计数:用刻度吸管吸取甲液 1 mL 置于小试管中,用沙利氏吸血管吸血到 20 μL 处,擦去管外粘附的血液,吹入吸管中,反复吹、吸数次,使混合均匀。在上述试管中加入乙液 1 mL,混合振荡 5 min,取此稀释了 100 倍的血液,冲入计数室,计数四角四个大方格内的白细胞数量。②结果判断:在 10×40 倍显微镜下观察,红细胞的细胞质为微黄色,核为淡蓝色;粒性白细胞被中性红着色;淋巴细胞比红细胞大;凝血细胞呈卵圆形,透明呈玻璃样、带暗绿色阴影,细胞质与细胞核之间无明显的界限,一端或两端有明显的颗粒。

白细胞个数 / 微升 = 四角四个大方格内的白细胞数 / 4 × 100 × 10。

2.4 数据分析

数据统计分析采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析和多重比较。

3 结果与分析

3.1 法氏囊病抗体效价测定结果

由表 2 可以看出,给药后,芪芍增免散 3 个不同添加剂量较对照组均能不同程度地提高法氏囊

的抗体水平。其中,芪芍增免散 1.0%组的效果最好,在免疫后的各个检测日龄抗体水平不仅显著高于对照组 ($P < 0.01$),而且还显著高于自身的 1.5%剂量组和 0.5%剂量组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),使抗体水平长时间维持在较高水平,如 56 日龄时法氏囊抗体的水平仍达 7.86 log₂。这表明芪芍增免散 1.0%组与法必妥疫苗配合使用,能够更好地增强机体的体液免疫机能,提高机体的抵抗力。

3.2 芪芍增免散对法必妥疫苗免疫鸡脾脏指数的影响

由表 3 可以看出,给药后芪芍增免散 3 个不同添加剂量较对照组均能不同程度地提高脾脏指数。各用药组之间差异不显著 ($P > 0.05$),以芪芍增免散 1.0%组作用效果较好。这表明芪芍增免散不同添加剂量与法必妥疫苗配合使用,都能够比较好地促进脾脏发育,提高脾脏指数,从而进一步提高机体的抵抗力。

3.3 芪芍增免散对法必妥疫苗免疫鸡法氏囊指数的影响

由表 4 可以看出,给药后芪芍增免散 3 个不同添加剂量较对照组均能不同程度地提高法氏囊指数。各用药组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。这表明芪芍增免散不同添加剂量与法必妥疫苗配合使用,都能够比较好地促进法氏囊的发育,提高法氏囊指数,从而进一步提高机体的抵抗力。

3.4 芪芍增免散对法必妥疫苗免疫鸡外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值的影响

由表 5 可以看出,给药后,芪芍增免散 3 个不同添加剂量较对照组均能不同程度地提高外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值。统计分析表明,芪芍增免散 1.0%组的效果最好,在免疫后的各个检测日龄外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值均高于不用药对照组以及自身的 1.5%剂量组和 0.5%剂量组。这表明芪芍增免散 1.0%组与法必妥疫苗配合使用,能够更好地提高外周血液酸性-醋酸萘酯酶(ANAE)阳性淋巴细胞值,从而提高机体的抵抗力。

3.5 芪芍增免散对鸡免疫法必妥疫苗后外周血白细胞总数的影响

由表 6 可以看出,给药后,芪芍增免散 3 个不同添加剂量较对照组均能不同程度地提高机体外周血白细胞总数。统计分析表明,芪芍增免散

表 2 芪芍增免散对法必疫苗免疫鸡抗体效价影响

单位: log₂

组别	1 日龄	7 日龄	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄	49 日龄	56 日龄
芪芍增免散 0.5%组	7.25±0.55	4.30±0.57	5.36±0.75	6.14±0.54bc	6.46±0.66B	7.14±0.54BC	7.71±0.47Bc	7.87±0.52Bab	7.14±0.54BCa
芪芍增免散 1.0%组	7.25±0.55	4.30±0.57	5.73±0.46A1)	6.73±0.70Aa	7.20±0.68A	7.87±0.52Aa	8.53±0.52Aa	8.79±0.58Aa	7.86±0.54A
芪芍增免散 1.5%组	7.25±0.55	4.30±0.57	5.64±0.50A	6.53±0.64ab	6.93±0.59a	7.53±0.64AB	8.21±0.58Aab	8.57±0.51Ab	7.53±0.52AB
对照组	7.25±0.55	4.30±0.57	5.07±0.62Bb	6.07±0.59C	6.36±0.75Bc	6.93±0.62Cc	7.29±0.47B	7.00±0.68C	6.64±0.75Cb

1): 同一列标记不同小写字母代表差异显著(P<0.05), 同一列标记不同大写字母代表差异极显著(P<0.01)。下表同。

表 3 芪芍增免散对法必疫苗免疫鸡脾脏指数的影响

单位: mg/g

组别	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄	49 日龄	56 日龄
芪芍增免散 0.5%组	0.83±0.18	1.58±0.18ac	2.43±0.18	3.09±0.10	3.24±0.14	3.05±0.20B	2.44±0.23
芪芍增免散 1.0%组	0.86±0.15a	1.64±0.16	2.48±0.09a	3.14±0.11	3.32±0.13A	3.44±0.16Aa	2.67±0.26A
芪芍增免散 1.5%组	0.86±0.18a	1.68±0.19ab	2.49±0.17a	3.13±0.15	3.29±0.10A	3.30±0.16Ab	2.63±0.15A
对照组	0.73±0.15b	1.56±0.14c	2.37±0.14bB	2.98±0.25	3.16±0.13B	3.04±0.19B	2.31±0.16B

表 4 芪芍增免散对法必疫苗免疫鸡法氏囊指数的影响

单位: mg/g

组别	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄	49 日龄	56 日龄
芪芍增免散 0.5%组	2.15±0.09	3.07±0.22	3.67±0.18	4.50±0.19c	5.07±0.17	4.95±0.17	4.35±0.21
芪芍增免散 1.0%组	2.18±0.09	3.12±0.23a	3.76±0.24	4.79±0.37ab	5.14±0.14Aa	5.05±0.25A	4.45±0.19
芪芍增免散 1.5%组	2.16±0.08	3.17±0.14A	3.75±0.23	4.77±0.24bA	5.12±0.13A	5.02±0.19a	4.46±0.18
对照组	2.14±0.10	2.96±0.19Bb	3.63±0.19	4.39±0.17cB	4.94±0.18B	4.82±0.27Bb	4.33±0.21

表 5 芪芍增免散对法必疫苗免疫鸡 ANAE 阳性淋巴细胞值的影响

单位: %

组别	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄	49 日龄	56 日龄
芪芍增免散 0.5%组	29.13±1.48	31.03±1.16	33.43±1.16	33.77±1.24	34.33±1.10	34.77±1.37	35.27±1.25
芪芍增免散 1.0%组	29.50±1.40	31.80±1.33 a	33.83±1.70	34.37±1.19	34.70±1.68	34.93±1.18	35.83±1.52
芪芍增免散 1.5%组	29.43±1.13	31.67±1.32	33.77±1.02	34.10±1.31	34.53±1.13	34.87±1.45	35.43±1.51
对照组	28.97±0.93	30.83±1.18b	33.20±1.00	33.50±1.32	34.10±1.49	34.37±1.86	34.80±1.31

表 6 芪芍增免散对法必疫苗免疫鸡外周血白细胞总数的影响

单位: 10⁴ 个/mm³

组别	14 日龄	21 日龄	28 日龄	35 日龄	42 日龄	49 日龄	56 日龄
芪芍增免散 0.5%组	2.26±0.11	2.30±0.08	2.39±0.14	2.48±0.09	2.52±0.14	2.70±0.19	2.78±0.11
芪芍增免散 1.0%组	2.29±0.10a	2.33±0.07	2.41±0.12a	2.54±0.14a	2.60±0.15	2.74±0.16a	2.84±0.11
芪芍增免散 1.5%组	2.31±0.06aA	2.34±0.08	2.44±0.12a	2.56±0.10a	2.62±0.14a	2.75±0.12a	2.86±0.08A
对照组	2.21±0.07bB	2.29±0.09	2.32±0.11b	2.44±0.12b	2.49±0.17b	2.60±0.13b	2.70±0.13B

1.5%组作用效果较好, 但是各用药组之间差异不显著(P>0.05)。这表明芪芍增免散不同添加剂量与法必妥疫苗配合使用, 都能够促进机体外周血

白细胞总数的增加, 提高机体非特异性免疫水平。

(下转第 50 页)

一例猫淋巴肉瘤的临床诊治

陈义洲¹, 黄婉婷¹, 叶镜岳²

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 惠州市农业学校, 广东 惠州 516023)

摘要: 通过对一只 16 岁的患有消化型淋巴肉瘤的猫进行了比较详细的临床检查、影像学检查、血液学检查、病理学检查, 并对患猫进行剖腹探查手术, 同时对猫淋巴肉瘤的相关资料进行回顾, 以加深对猫淋巴肉瘤的症状、诊断、治疗和转归的了解, 为以后的临床诊疗提供参考。

关键词: 猫; 淋巴肉瘤; X-ray; B 超

中图分类号: S858.293

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0042-05

Clinical diagnosis and treatment of feline Lymphosarcoma

Chen Yizhou¹, Huang Wanting¹, Ye Jingyue²

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Huizhou agricultural school, Huizhou 516023, China)

Abstract: By detailed clinical examination, imaging tests, blood tests, pathological examination, and performed the laparotomy of a 16-year-old cat which suffering from digestive lymphosarcoma, referred to the lymphosarcoma information, we got deeper understanding of the symptoms, diagnosis, treatment, and outcome of lymphosarcoma in cat, it's can be provided a reference for future clinical diagnosis and treatment.

Key words: Cat; Lymphosarcoma; X-ray; Ultrasound

淋巴肉瘤(Lymphosarcoma)是原发于淋巴结或其他淋巴组织的恶性肿瘤,犬、猫均可发生。淋巴肉瘤类型较多,按解剖部位可分为多中心型、消化型和胸腺型淋巴肉瘤。在猫,淋巴肉瘤较为常见,并与猫的白血病有密切关系。据文献报道,目前已分离出 Snyder-Theilen、Gardner-Armstein 和 McDonough 等 FeLV 病毒株,基因组内含有 fes 肿瘤基因。由猫白血病病毒(FeLV)引起的淋巴瘤,临床上以胸腺和肾淋巴瘤最常见,其次为消化道型、淋巴结型、肝型、皮肤型、眼型和中枢神经型,骨髓性白血病罕见^[1]。临床上可通过触诊、X 线摄影、超声波、血常规、血清生化等手段检查,从而做出初步诊断,确诊需要进行病理组织学检查。

为提高国内兽医对猫淋巴肉瘤的认识,我们对一例就诊的猫进行了比较详细的检查和初步的治疗,以加深对本病的了解,为以后的诊断和治疗积累经验。

1 病例情况

家猫,16岁,雌性,已绝育,体重3.1kg,源自于华南农业大学动物医院的临床病例。就诊前一个月出现间歇性腹泻,一周前发现食欲减退,可视粘膜颜色正常,浅表淋巴结未见肿大。腹部触诊发现中后腹部有一拳头大肿块,质地较硬。体温37.5℃,心跳110次/分钟,律齐,呼吸平稳。

2 实验室检查

2.1 B超检查

腹部及双侧肾的区域剃毛,分别用5.5MHZ和7.5MHZ的探头扫描腹部器官,保存扫描的结果。

腹部超声检查可见腹腔中后部,肾脏后方有一中等回声团块影像,团块周围有散发性液性暗区,血流丰富(见图1)。双侧肾脏表面有中等回声突出于肾包膜的团块样影像,肾髓质结构清楚。大小未见异常(见图2)。

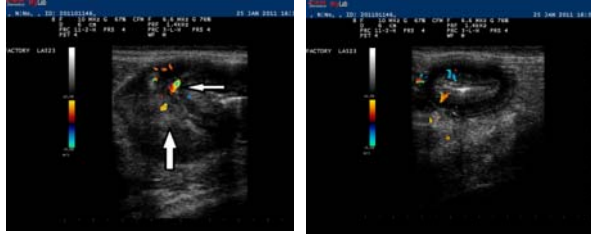


图1 腹部肿块B超影像

可见一中等回声团块(大箭头),团块中有血流经过(小箭头)

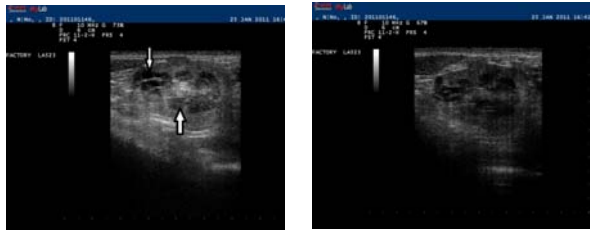


图2 肾脏B超影像

可见双侧肾脏表面有中等回声突出于肾包膜的团块样影像(小箭头),肾髓质结构清楚,仍能看到肾脏的结构形态(大箭头)。

2.2 X线检查

给患猫进行X线检查,分别拍摄猫腹背位和侧卧位的X线平片。条件分别为腹背位82kVp、2mAs;侧卧位89kVp、2mAs。

侧位X线检查可见在中后腹部有一中等密度团块,团块将大部分肠管往腹腔背侧和后侧推移,肠管鼓气(见图3);正位X线检查可见该团块位于中腹部偏右侧,小肠被挤压到右侧(见图4)。

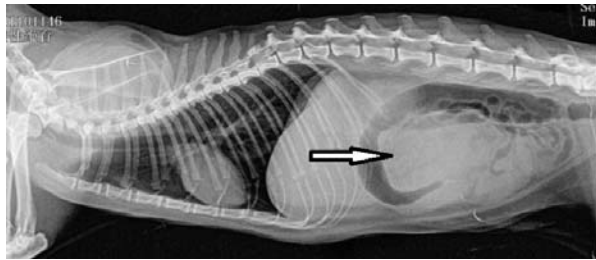


图3 左侧卧X线片

2.3 血清生化检验

空腹经桡静脉采血2 mL进行血清生化检验:血清生化检验项目包括:谷丙转氨酶(Alanine Aminotransferase,ALT)、谷草转氨酶(Aspartate Aminotransferase,AST)、总蛋白(Total Protein, TP)、白蛋白(Albumin,ALB)、球蛋白(Globu-



图4 腹背位X线片

lin, GLB)、肌酐(Creatinine, CREA)、尿素氮(Blood Urea Nitrogen, BUN)、总胆红素(Total Bilirubin, TBIL)、直接胆红素(Direct Bilirubin, DBIL)、间接胆红素(Indirect Bilirubin, IBIL)、钙离子(Calcium, Ca^{2+})、尿酸(Uric Acid, UA)、葡萄糖(Glucose, GLU)、淀粉酶(Amylase, AMY)。

血清生化检查可见ALB、A/G数值降低,DBIL、BUN、CREA、CA数值升高,其他未见异常,见表1。BUN、CREA升高提示肾前性及肾性疾病,意味着肾功能的恶化。ALB及A/G比例减少提示肝功能异常。DBIL的升高提示胆道梗阻,肝胆问题。

3 初步诊断结果

综合考虑以上检查结果做出初步诊断,患猫腹腔有一实质性肿块,肾表面凹凸不平,有实质性肿块,肝肾功能异常。

4 手术治疗

与主人沟通后,决定对患猫进行开腹探查手术,根据探查情况进行下一步的治疗和处理。术前用药:5%葡萄糖氯化钠注射液100 mL、肌苷2 mL静脉滴注。速诺(Synulox-RTU阿莫西林+克拉维酸)0.2 mL皮下注射。痛立定(Tolfedine)0.3 mL皮下注射。用静安舒0.3 mL(0.1 mL/kg)镇静,10 min后静脉推注CD(Alfaxalone阿法沙龙)0.3 mL进行诱导麻醉,用异氟醚维持麻醉,按腹部手术常规保定、剃毛消毒。沿腹中线切开皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉层,止血,暴露腹腔,用温盐水浸润纱布块,铺在切开口四周,拉出腹腔内肠管进行检查,移开肠管,暴露腹腔器官。发现肿

表 1 血清生化检验结果

代号	项目名称	结果	参考值	单位
ALT	谷丙转氨酶	36.3	10~50	IU/L
AST	谷草转氨酶	30	10~50	IU/L
AS:AL	谷草:谷丙	0.83		
TP	总蛋白	55.6	50~80	g/L
ALB	白蛋白	12.9	23~35	g/L
GLB	球蛋白	42.7	26~50	g/L
A/G	白蛋白/球蛋白	0.30	1.5~2.5	
TBIL	总胆红素	6.6	2~17	$\mu\text{mol/L}$
DBIL	直接胆红素	3.0	0~2	$\mu\text{mol/L}$
IBIL	间接胆红素	3.60	2~18	$\mu\text{mol/L}$
BUN	尿素	21.5	5.9~10.5	mmol/L
CREA	肌酐	180.6	50~180	$\mu\text{mol/L}$
BUN/CR	尿素/肌酐	0.12		
UA	尿酸	32	0~60	$\mu\text{mol/L}$
GLU	葡萄糖	6.0	3.9~8	mmol/L
AMY	淀粉酶	1562	500~1800	U/L
CA	钙	3.25	2.2~2.6	mmol/L

块位于中腹部,从十二指肠中段至回肠前段肠管均被肿块所包裹,肿块大小约(9×4)cm,肿块表面凹凸不平,大网膜部分与肿块粘连,表面大量血管分布,质地较硬,呈肉色(见图5)。由于腹腔大部分器官均已受波及,经与主人商量后决定施行安乐死。死后剖检发现,肾脏色泽苍白,表面凹凸不平滑,表面出现大量散发性大小不一的白色圆形结节,一侧肾脏有萎缩(见图6);肝脏色泽变红,质地稍硬,表面出现大量散发性大小不一的白色圆形结节(见图7)。

肠道大部分被肿瘤包埋,肠系膜淋巴结肿大,肿块表面凹凸不平,大网膜部分与肿块粘连,表面大量血管分布,质地较硬,呈肉色。

肾脏和肝脏表面有大量散发性、大小不一的白色圆形结节,双侧肾大小不一。

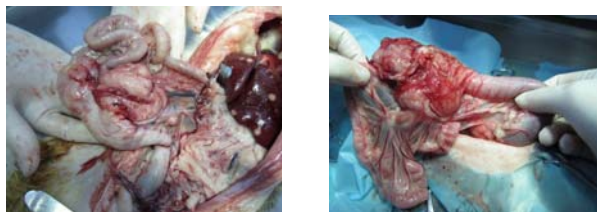


图 5 开腹探查手术中肠道肿瘤

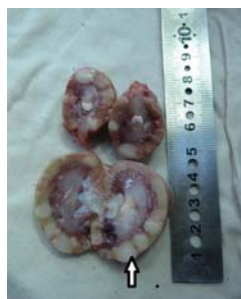


图 6 剖检的肾脏



图 7 剖检的肝脏

5 病理组织学检查

肝脏(小箭头所指为肝脏细胞)周围见明显淋巴样增生灶,肿瘤细胞(大箭头所指)中等大小,细胞核大小不等,核质浓稠,见较多坏死。间质成分较少(见图8)。40倍镜下可见肠道周围及肠道内有大量明显淋巴样增生灶;100倍镜下可见肿瘤细胞中等大小,细胞核大小不等,核质浓稠,见较多坏死。间质成分较少(见图9)。诊断为淋巴肉瘤。

6 讨论

6.1 病因学探究

淋巴肉瘤(Lymphosarcoma)有两种:一种发生在淋巴样器官和组织,称为恶性淋巴瘤,外周血液中可能存在有肿瘤细胞(淋巴细胞)。另一种发

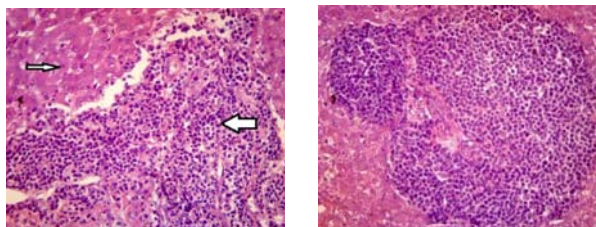
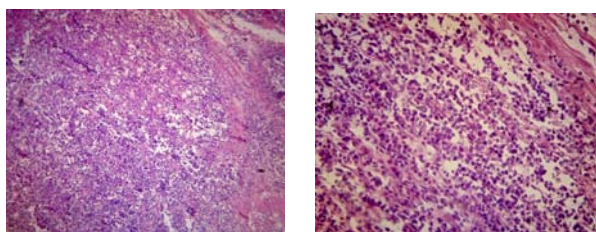


图8 肝脏病理切片(100倍)

图9 肠道病理切片
(左图为40倍,右图为100倍)

生在骨髓,称为淋巴样白血病,外周血液中经常可见肿瘤细胞(淋巴细胞),其病因尚不明确,但猫白血病病毒可能是部分猫淋巴肉瘤的病原。调查表明患白血病的猫,有1/3发展成淋巴肉瘤,患淋巴肉瘤的猫,近70%猫白血病病毒检验阳性^[2]。临床上FeLV引起的淋巴肉瘤以胸腺和肾淋巴瘤最常见,其次为消化道型、淋巴结型、肝型、皮肤型、眼型和中枢神经型,骨髓性白血病罕见^[1]。有报道目前已分离出Snyder-Theilen、Gardner-Armstein和McDonough等FeLV病毒株,皆是复制缺失性而具转化能力的病毒,基因组内含有fes肿瘤基因。

本病例中,通过病理组织学检查确诊患猫腹腔肿块为淋巴肉瘤,并已扩散至大部分腹腔器官,但仍不能确定引发淋巴肉瘤的具体原因。

6.2 临床分类

淋巴肉瘤以解剖部位来分有犬和猫多中心淋巴肉瘤、消化道淋巴肉瘤、胸腺淋巴肉瘤、皮肤淋巴肉瘤和淋巴白血病。猫还有中枢神经系统淋巴肉瘤、肾和眼睛淋巴肉瘤。

多中心淋巴肉瘤主要表现为精神沉郁、消瘦、全身所有淋巴结呈对称性肿大,脾和肝也肿大。体表淋巴结均可触及到肿大的硬块。患猫表现消瘦、贫血、减食、精神沉郁等症状。

消化道淋巴肉瘤表现消瘦、呕吐和腹泻,胃肠壁和肠系膜上淋巴组织都肿大。主要以肠道淋巴组织或肠系膜淋巴结出现B细胞淋巴瘤组织为特

征。腹外触压内脏可感觉到有不同形状的肿块,肝、肾、脾肿大。临床上可见可视黏膜苍白,贫血,体重减轻,食欲减退,有时有呕吐腹泻。此型约占全部病例的30%。

胸腺淋巴肉瘤通常仅限于胸腺发生,严重的整个胸腺组织被肿瘤组织所代替。有的波及纵隔前部和膈淋巴结。由于纵隔膜及膈淋巴形成肿瘤,压迫胸腔形成胸水,可造成严重呼吸困难,使患猫张口呼吸,致循环障碍,表现十分痛苦。进行X线照相可见胸腔有肿物的存在。临床解剖可见猫纵隔淋巴瘤达300~500g。该类型多为原发性的,见于青年猫。

皮肤淋巴肉瘤主要是皮肤和皮下有散在或密布的米粒至指头大小的硬结节。结节部位脱毛,有的形成痂皮或溃疡。皮肤淋巴肉瘤常发展成多中心淋巴肉瘤。

淋巴白血病主要表现间歇热,食欲下降,机体消瘦,黏膜苍白,黏膜及皮肤上出现出血点。实验室检验可见白细胞总数增多,淋巴样肿瘤细胞增多,有时可达100 000个/ μ L。红细胞、颗粒细胞和血小板减少。其它组织器官淋巴肉瘤的临床症状,都与其患病组织器官有关。初期表现为骨髓细胞异常增生。由于白细胞引起脾脏红髓扩张会导致恶性病变细胞的扩散及脾脏肿大,肝脏肿大,淋巴结轻度至中度肿大。确诊须进行活组织(如淋巴结、骨髓等)检查。

肾脏肿瘤,如果淋巴瘤在肾脏,猫也许增加了水消耗量和增加排尿。肾脏的淋巴瘤可发现双边肾脏扩大或萎缩。

6.3 治疗方法与预防

在猫,消化型和胸腺型是最普遍的,多中心型却少见。消化型的临床症状包括严重的腹泻或痢疾,经常伴随着厌食和呕吐,外周淋巴结和扁桃体肿大、质硬,肝和脾肿大;严重者淋巴结可能坏死甚至部分液化。有的在肝、脾、心、肺等器官出现结节状肿瘤。

淋巴结瘤的治疗尚无有效方法。虽然可以通过药物或手术等方法进行缓解或切除,但通常效果不大。以下列举一些临床上用到的方法。

药物治疗。可使用强的松龙(可改善症状,使淋巴结肿瘤消退,但不能降低死亡率)^[3]或地塞米松、环磷酰胺、苯丁酸氮芥和叶酸拮抗剂(如氨甲

嘌呤) 等治疗, 可一定程度地缓解症状。但上述药物使用过量会引起中毒, 发生紫癜和乏力等。此时应停药, 然后根据病情决定是否继续服药^[4]。当恶性肿瘤无法切除, 或有转移的高危险性、或已经转移时, 就必须考虑进行化学治疗, 而化学治疗的药剂就会去破坏那些增殖快速的细胞, 如: 肿瘤细胞、骨髓细胞、毛发细胞等, 所以大多的化学治疗药剂都会引起掉毛、骨髓抑制(贫血、白血球减少、血小板减少)等副作用^[5]。

手术切除治疗。进行超声波扫描确认团块内组成, 当影像学检查(超声波扫描、X线、或断层扫描)无法确认腹腔内的问题时, 就必须将腹腔切开来直接检查。因为任何的影像学检查都无法取代直接的视诊及触诊。这就是探测性剖腹术^[5]。开腹探查后, 可直接通过腹腔内肿瘤的生长程度和扩散程度决定下一步的治疗和处理。若肿瘤未严重扩散, 可进行手术切除缓解, 再对病料制造病理切片, 判断肿瘤类型。

单克隆抗体治疗法。医学方面有报道利用单克隆抗体注射对淋巴肿瘤的治疗, 结果表明可使循环中的肿瘤细胞暂时降低并可暂时改善病人的临床症状^[6]。但结果观察到病人会产生不同的副作用, 持续治疗后发现病人会产生抗体, 降低治疗效果。

艾灸疗法。艾灸能改善肿瘤患者临床症状, 迅速缓解疼痛和放、化疗副反应^[7]。实验研究也表明, 艾灸能抗 S180 实体瘤^[8]。有文献报道, 用艾灸疗法对接种肿瘤的小鼠进行治疗和对照, 结果表明艾灸能抑制肿瘤生长, 对免疫功能有增强效应。艾灸对荷瘤鼠腹腔 M Φ 吞噬能力、杀伤活性、IL-1 诱生能力有显著促进作用^[9]。艾灸对小鼠的恶性肿瘤有明显的抑制作用并能延长小鼠的生存期限。虽然未发现艾灸使用在犬猫上的文献或报道, 从实验中看值得一试。

ECT 电化学疗法。这是一种利用两电极处组织发生的电化学反应, 改变肿瘤组织内环境, 从而达到抑癌效应的一种物理疗法^[10]。恶性肿瘤细胞对此反应较正常细胞更为敏感, 更易受损伤, 从而达到杀伤肿瘤细胞的作用^[11]。实验结果表明电化学疗法具有明显抑制肿瘤细胞生长, 降低肿瘤转移率的作用。电化学疗法与化疗药物合用效果更佳^[10]。ECT 电化学疗法能大大降低药物疗法或化

疗带来的毒副作用, 但这种方法只能用于局部治疗, 因此采用此方法的时候需要结合其他疗法进行综合治疗。

报道上的治疗方法多种多样, 但在实际应用中比较多数使用药物治疗和手术切除方法。

本病例中, 就诊程序就是按照常规的进行血液生化检查, 确定肝肾功能障碍, X线和B超检查, 确定肿瘤位置后进行手术探查后切除肿瘤和术后药物治疗相互结合, 但在开腹探查后发现肿瘤已扩散、转移到各个重要器官, 并已经影响器官的功能作用, 手术治疗无法切除。根据文献研究, 假如有条件和设备, 手术探查不能进行切除处理的, 可以进行化学疗法, 但化学疗法主要用于人类医学, 在动物医学上国内还未普及。一般来说, 淋巴肿瘤若用手术方法无法进行, 则很难治愈。猫的病程短, 因此患淋巴肿瘤的病例通常在确认后就施行安乐死。本病例中, 从患猫的开腹探查术发现患猫的肿瘤属于发展严重的中晚期肿瘤, 加上患猫已一个星期少吃少喝, 并拉稀一个月, 身体极度虚弱, 此时并不适合使用化疗方法治疗, 只会加速病情恶化, 加快患猫死亡。因此医生建议对患猫进行安乐死。

参考文献:

- [1] 丁明星, 利凯, 夏兆飞. 猫肾淋巴瘤型白血病一例[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(12): 85-86.
- [2] RNA 肿瘤病毒与动物肉瘤[J]. 37c 医学网, 2004
- [3] 侯加法. 小动物疾病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 345-347.
- [4] 孙武, 杨颗粒, 张洪权. 动物疾病病理诊断[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001: 124-126.
- [5] 林政毅. 正确面对肿瘤疾病. <http://blog.sina.com.cn/doctorcat1229>.
- [6] 阎岩. 应用单克隆抗体治疗白血病和淋巴瘤[J]. 单克隆抗体通讯, 1987, (3): 91-92.
- [7] 马晓凡, 褚芹. 灸法治疗肿瘤研究进展[J]. 浙江中医杂志, 2000, 235(8): 360
- [8] 唐照亮, 陈森和, 宋小鸽, 等. 艾灸抗小鼠 S180 实体瘤的实验研究[J]. 针刺研究, 1999(1): 60.
- [9] 杨志新, 张晓峰, 赵粹英. 艾灸对小鼠淋巴瘤的治疗及对免疫功能的增强效应[J]. 辽宁中医杂志, 2001, 28(10): 635-636.
- [10] 张文霞, 孙慧, 王立新, 等. 电化学疗法对恶性淋巴瘤的实验研究[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(2): 174-175.
- [11] 郭伟剑. 恶性肿瘤的电化学疗法[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1996, 23(6): 349.

豹纹守宫的人工饲养与繁殖

胡琳, 李思瑶, 李翔宇, 刘清神*

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 豹纹守宫是一种新的特种经济动物, 饲养历史短, 发展空间大。本文总结了守宫的适宜饲养环境和日常管理方法; 提供了准确判断守宫的发情期并进行交配的方法, 增加受孕率, 使繁殖顺利进行。通过本文的经验与方法总结, 促进了豹纹守宫的稳定繁殖。

关键词: 豹纹守宫; 饲养; 繁殖

中图分类号: S858.93

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0047-04

豹纹守宫(*Eublepharis macularius*), 拉丁意为“有眼睑和斑点的”一种守宫, 英文名为 Leopard Gecko, 属脊索动物门, 爬行纲, 蜥蜴目, 睑虎科。原产于巴基斯坦、印度、伊朗和阿富汗等亚热带地区, 为沙漠干燥区生活的地栖品种, 因为其黄色的体色上分布黑色的斑纹, 颇似美洲豹身上的花色, 豹纹守宫的名字由此而来。其性情温顺可爱, 加上肥胖的身体和尾巴, 非常吸引人。其所需饲养空间小, 而且在人工饲养繁殖下不断改良出新的花色品系, 这使得豹纹守宫一直深受欢迎。豹纹守宫是最早被当做宠物饲养的守宫, 人工饲养的历史已经有 20 多年, 欧美等国在多年成功繁殖的基础上, 更加致力于颜色与品系上的研究与改良^[1]。本实验总结了豹纹守宫的人工饲养繁育的方法以及防病等日常管理措施, 为豹纹守宫的规模化饲养繁殖提供参考。

1 饲养环境

1.1 饲养盒布置

饲养豹纹守宫的饲养盒构造比较简单, 可使用塑料保鲜盒, 体积大约为 35cm×25cm×15cm, 以满足守宫日常活动所需的空間。饲养盒内铺设爬虫专用的沙漠砂(爬虫沙), 因其成本较高, 在大量饲养守宫的情况下可以选择普通纸张来代替(例如厨房纸有很好的吸水性)。盒内需安置躲避穴、水盆、钙粉盒和温湿度计等。因豹纹守宫是夜行性动物, 特别是白化品系的守宫, 由于体内缺少黑色素而极其怕光, 故需要躲避穴作为白天休息的场所。通过长期观察发现, 人工饲养中有躲避穴

居住的守宫比没有躲避穴居住的守宫要胆怯很多, 因为守宫大多数时间躲避于躲避穴中, 很少对生存的外间环境进行熟悉和探索。在野外生存的守宫日常所需要的矿物质是通过舔舐土壤来获得, 因此人工饲养下需要放置钙粉盒, 以便守宫补充所需的钙质和维生素等。温湿度计用于随时检测饲养环境的温度和湿度, 便于人工调控。

1.2 环境温度和湿度控制

温度是守宫健康生存不可缺少的条件, 适当的温度有助于守宫顺利消化食物, 所以饲养过程中要保证其生长环境温度的稳定性。豹纹守宫一般采用单独饲养, 既可以减少个体间的打斗、疾病的传染, 也便于控制守宫摄取的食物数量, 而且有利于准确掌握每一只守宫个体的健康状况, 便于管理和记录。因为豹纹守宫原产地为亚热带地区, 同时又是地栖动物, 所以在人工饲养条件下, 饲养环境为地栖干燥型, 日间温度应尽量控制在 25~30℃, 夜间温度为 20~23℃, 湿度应控制在 40%^[1]。同时也要保持饲养盒内垫纸的干燥, 如需增加湿度(如蜕皮)时, 可喷少量的水于饲养盒壁上。广州的夏天高温炎热, 温度适合守宫生长, 而当其它季节温度低于 26℃时, 守宫捕食后很难消化食物, 这时需要采用 ACT-300 温度控制器及加热垫进行加热。同时, 饲养室的室内温度也需控制在 20℃左右, 并加强通风换气, 保持空气清新。

2 日常管理

2.1 活体饲料的选择和喂食量

豹纹守宫属肉食性动物, 在野外生存时主要采

收稿日期: 2012-08-16

*: 通讯作者

基金项目: 华南农业大学大学生科技创新项目(2011/2012); 华南农业大学 2010 年教育教学改革与研究项目(JG10124)

食蟋蟀、蟑螂等昆虫。我们按照豹纹守宫的野外生态习性,采用活体饲料喂养。考虑到饲料采购的方便性和饲养难易度,可供喂养的活体饲料有蟋蟀、乳鼠、大麦虫等。蟋蟀和大麦虫营养丰富,是使用比较普遍的活体饲料,其采购方便、成本低、人工饲养也较容易,但是大麦虫所含的脂肪较高,长期食用会使守宫出现肥胖等问题。乳鼠虽然成本较高,却是繁殖期的豹纹守宫补充营养的最佳饲料。另外,在活体饲料的人工饲养过程中要适当添加钙质、维生素和多种微量元素,以便守宫补充摄取。

豹纹守宫的喂食一定要有规律,并且要掌握适当的喂食量。豹纹守宫会自由采食所喂食的活体饲料,所选活体饲料大小不宜超过守宫头部大小的 $\frac{2}{3}$,成体和亚成体的豹纹守宫可喂食蟋蟀或者大麦虫。成体可喂食3~4只,每隔2天喂食一次;亚成体喂食2~3只,每隔1天喂食一次;幼体可喂食针头蟋蟀或者小面包虫,鉴于豹纹守宫幼体的生长速度较快,需每天喂食一次,喂食量根据观察并记录其采食量而定。每次喂食完毕之后要仔细检查饲养盒和架子之间是否留有缝隙,防止守宫丢失。

2.2 蜕皮管理

豹纹守宫的蜕皮频率和其生长速度有着密切的关系,健康的成年个体每个月蜕皮1次,亚成体和幼体的生长速度较快,每个月蜕皮2~3次。豹纹守宫蜕皮前不取食,身体变得灰白,象蒙了一层薄纱,此时对空气的湿度要求很大。在此期间应在饲养盒壁上喷少量的水来增加环境湿度,可有助于守宫顺利完成蜕皮这一过程。正常情况下,从头部开始,豹纹守宫可自行完成蜕皮的过程并将蜕下的皮吃掉。在野外环境生存时,将蜕下的皮吃掉可以很好地保护自己不被其他天敌发现行踪。但是当环境湿度不够时,守宫很容易出现蜕皮不畅的情况,没有蜕下来的皮包裹指趾,会造成不同程度的组织坏死或损伤。这时就需要人为帮助守宫蜕皮。可先将守宫放入盛有少量的温水的盒子中浸泡5 min,水的深度以没过守宫的指趾为宜,水温控制在 $23\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,然后用夹子帮守宫撕掉包裹在肢体上的死皮,这样可减少因用力拉扯死皮对守宫指趾造成的伤害。

2.3 断尾

豹纹守宫又粗又长的大尾巴里面储存着大量的脂肪和水分,供它们在找不到食物或冬眠时补充

能量。在野外环境生存时,遇到天敌时会采取断尾(自割)的方式自我保护,因为断落的尾部有少量神经系统,会跳动一段时间用来迷惑敌人,从而为自己制造逃生的机会。守宫的断尾是一种自卫,当它受到外力牵引或者遇到敌害时,尾部肌肉强烈收缩,尾部自动断落,断尾后创面露出橘子瓣状的肌肉组织,同时会有少量血液渗出^[2]。在人工饲养环境下,豹纹守宫在受到惊吓时同样会出现断尾的情况,这时可用云南白药粉末进行消炎止血。断尾的守宫暂时停止喂食,静养几天,待伤口愈合后即可正常喂食。豹纹守宫会在断尾后20天左右生长出新的尾巴,新生尾巴皮肤表面无螺纹,而且比之前的尾巴肥大短粗。为避免守宫发生断尾,应在抓取守宫的时候轻拿轻放,尽量不要抓取守宫的尾部。

2.4 常见疾病的防治

2.4.1 拒食 拒食是豹纹守宫在饲养过程中常见的情况。拒食的原因有很多,例如温度和湿度过低,导致豹纹守宫的消化能力下降,此时会出现拒食的情况;处于发情期、蜕皮前期和产蛋前期的豹纹守宫也会出现拒食的情况;有些个体也会因为原虫性寄生虫等原因引起肠胃炎而出现拒食。在人工饲养环境中,一旦豹纹守宫出现拒食,应检查温度和湿度是否适宜,并及时调整环境温湿度。排除环境因素之后进而根据排泄物的形状颜色判断个体是否出现肠胃炎等疾病,可参照下文肠胃炎的防治措施进行改善。对于处于发情期、蜕皮前期等特殊时期的守宫出现拒食属于正常情况,在其蜕皮和产蛋之后会恢复正常进食。

2.4.2 肠胃炎 豹纹守宫患有肠胃炎的症状为拒食,形体日渐消瘦,排泄物不成形且有腥臭味。引起豹纹守宫肠胃炎的因素分为3种:一是因为吞食体积过大的食物或食物中含有坚硬部分例如蟋蟀后足上的刺,在吞食过程中引起消化道的物理性损伤,从而造成发炎感染引起肠炎;二是因为饲养环境不够干净卫生,如饮用了未及时更换的不干净的水,或者吃了不洁的食物,导致体内滋生病菌病毒或寄生虫,从而引起腹泻;三是温度过低,守宫进食后消化能力降低,导致食物在守宫肠道停留时间过长而引起霉变,从而导致肠胃炎的产生,此时的排出物往往伴有腥臭味。

豹纹守宫一旦患有肠胃炎要立即将其隔离饲养,避免病菌传播,并把饲养温度提高至 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。高

温有利于守宫消化,尽快排除体内的消化物。然后是单独准备一套喂养器械给患肠炎的豹纹守宫,避免反复使用器械产生交叉传染。在清理患病守宫的饲养盒或者接触患病守宫及其水盆、躲避穴等物之后要及时洗手,避免病菌传染给其他守宫。

患有肠胃炎的守宫在隔离的第1~2天内停食停水静养,第3天开始使用一些调理肠道的药物。例如美国的Nutri BAC,加入水盆中用注射器喂给守宫或者让其自行舔食,可以有效调节肠道内的益生菌平衡。直至第5天可进行少量喂食,选取体积大小约为患病守宫头部大小1/3的食物,例如蟋蟀,可将其头和四肢去掉,然后蘸取BAC进行喂食,如果守宫拒食,可夹取蟋蟀反复涂抹于守宫嘴边,让其舔食。按照上述方法调理7~10天后守宫会慢慢进食。根据其排泄物的颜色和形状判断其病情是否好转。喂食要定时定量,不可过多喂食,且食物不能太大,同时要做好卫生工作,防止病情反复。

2.4.3 缺钙 钙是豹纹守宫骨骼发育的基本元素,缺钙会导致豹纹守宫身体及四肢骨骼弯曲变形,因此从守宫出壳开始就应注重钙质的添加。补钙的方式有两种:一种是直接将钙粉放置钙粉盒内,守宫可自行舔食;另一种是在投喂食物时,将食物裹上钙粉后进行喂食。

2.4.4 缺维生素 豹纹守宫母体缺乏维生素,所产生的后代很可能出现发育不全的症状,最为显著的是导致眼睑缺失,产生“梅花眼”,即眼睑残缺不全,外形像梅花。更严重者会出现脊柱弯曲、四肢不全等特征。孕期的守宫要注重维生素的添加,可有效减少后代出现先天性的残疾。补充维生素的方法与补充钙质相同。

3 繁殖

3.1 辨别公母

豹纹守宫的公母辨别主要根据观察泄殖孔上方的V字排列的股孔和泄殖孔下方尾部的两个凸起,以上特征均为雄性特有的。成体的豹纹守宫可以直接用肉眼观察分辨性别,而亚成体则需要借助放大镜来观察V形股孔,一般3个月以内的幼体很难准确判定性别,只能根据孵化温度去推测^[3]。

3.2 判断发情期

豹纹守宫8个月可达到性成熟,发情期从每年开春开始持续到秋季。发情期前期守宫采食量明显减少,甚至出现拒食;雌守宫发情时会排卵,

肉眼可从守宫的腹部观察到。

3.3 选择种公种母

一般选择年龄在12个月以上,雄性守宫体重达到45g,雌性守宫体重达到55g的守宫作为繁殖对象。理论上雌性守宫8个月体重45g即可,但是为了保证子代足够健康,不能将他们做为繁殖对象,而是要挑选年龄更为成熟的个体,因此需选择体重55g以上身体状况良好而且成熟的雌性作为种母。种公则要求为体重45g以上的雄性,交配时公母分配比率为1:3。

3.4 产蛋

雌性受孕后日常活动会明显减少,孕期为1个月左右。在雌性怀孕20天左右要准备产盒,内置珍珠岩和蛭石为垫材,并于垫材上喷洒少量水,湿度控制在60%左右。雌性每次产蛋数为1~2枚^[3]。对于怀孕的雌性守宫要加强营养物质的补充,同时不能忽略钙质、微量元素和维生素的添加。

对于刚生产的蛋应先静置1h,待蛋壳成形变硬之后,可以先进行光照以判断是否受精(判断蛋是否受精的标准:在光照下看到蛋壳内有橘色圆环状物质,其中心有细胞核即已受精)并及时做好标记。这样可以标注守宫蛋的正确放置方向,以便在今后移动时可以准确的摆放。标明产蛋日期和父本母本的品系,随后便可放入孵化箱进行孵化。

3.5 孵化

孵化一般采用孵化箱进行加热孵化。其优点是便于控制温度,在孵化过程中不受外界因素的干扰,但是设备成本较高。因此有时候也可用加热垫和温控代替孵化箱进行孵化。准备干净的孵化盒并放入孵化材料和温湿度计,孵化材料选用珍珠岩和蛭石,孵化温度为28~32℃,孵化期一般为40~60天。孵化前2~3周可用温度控制性别,28℃以下孵化的性别多数为雌性,29℃孵化雌雄比例各半,30℃以上多数孵化个体为雄性。通常高温(雄性孵化温度)所孵化出的雌性,性格较为暴躁。在控制性别周期之后可适当提高温度以缩短孵化周期。

将要进行孵化的蛋放置孵化盒中,用孵化材料掩埋蛋身2/3。对于已经放置好的蛋要轻拿轻放,不可翻转,以免造成胚胎死亡。要保持孵化盒的湿度为40%左右,湿度过高会导致孵化盒内水汽过大,这时孵化盒壁上会有悬浮的水珠,蛋很容易沾到水汽而出现霉变。对于已经发霉的蛋要连

同周围的孵化材料一起及时清理出去, 以免影响孵化盒内其他的蛋^[3];湿度过低会使原本饱满的蛋变得干瘪, 这时应在孵化盒的四个角落分别加适量的水, 注意不可将水滴在正在孵化的蛋上, 以免导致蛋发霉腐烂。

对于已经出壳的豹纹守宫幼体要及时从孵化盒内取出, 单独置于饲养盒中进行饲养。1~2 天后, 待幼体排出黄绿色排泄物之后即可进食, 待幼体适应环境之后参照豹纹守宫的日常饲养措施进行饲养即可。

4 饲养体会

饲养与繁殖守宫, 需要日常细心的观察与记录, 并且认真做好饲养的基本工作。从采购饲料、喂食、日常护理、疾病防御等方面着手, 在每一个环节认真把关, 才能使得守宫正常生长并繁育出优良的品种。

4.1 日常饲养中每天都要为豹纹守宫更换饮用水, 并定期更换垫纸, 保持饲养环境的干净卫生。除了记录每只豹纹守宫的血统品系, 还要持续记录其采食量及体重变化。注意观察动物的健康状况和精神状况, 一般通过观察豹纹守宫的外观和其排泄物来判断个体的状态, 健康的个体尾巴肥硕, 四肢粗壮, 眼睛有神, 反应灵敏, 其排泄物为成形固体, 呈黑色或深棕色, 而且会带有黄色或白色的尿酸。对于健康状况不佳或精神沉郁的豹纹守宫应暂时停止喂食, 先静养几天观察记录其状况,

如粪便颜色、形状等。

4.2 在繁殖期即将来临之际, 应该准备干净的产盒, 盒内放置干净的珍珠岩和蛭石作为铺垫材料, 在日光下暴晒之后备用。在守宫顺利进行交配之后, 要及时记录交配的父母本和母本的品系, 以便雌性产蛋之后进行标记。繁殖期需要每天观察已经怀孕的雌性豹纹守宫的状态, 并及时查看是否已经生产。对于正在孵化的蛋也要及时查看孵化环境的温度和湿度, 并采取相应措施作出调整。

4.3 在饲养过程中, 除记录守宫的健康状况外, 要定期检查, 注意温度、食物、生活区的变化对守宫的影响。饲养中应格外注意防止疾病的传播, 及时将得病的守宫隔离, 集中治疗, 在治疗过后也要注意观察一段时间。饲养要注意卫生、规范。

5 实验成果

本实验室现已孵化出豹纹守宫幼体近 20 只, 待孵化的守宫蛋还有 30 多枚。目前各幼体生长状态均为良好, 还在持续观察记录中。我们制订了守宫饲养手册, 将饲养繁殖中的各项指标记录规范, 为守宫的规范化饲养提供参考依据。

参考文献:

[1] 潘硕钧. 守宫新视界[M]. 台湾: 威智文化科技出版, 2006: 76.
 [2] 豹纹守宫[ED/OL]. <http://baike.baidu.com/view/127994.htm>
 [3] Ron Tremper. The Herpetoculture of Leopard Geckos[M]. 97-116.

(上接第 41 页)

4 结论

综合分析芪芍增免散不同添加水平对鸡免疫法必妥疫苗后法氏囊病抗体效价水平、免疫器官指数、外周血液酸性 - 醋酸萘酯酶 (ANAE) 阳性淋巴细胞值和外周血白细胞总数的试验结果, 认为芪芍增免散 1. 0% 组综合作用效果最好, 所以把芪芍增免散 1. 0% 作为临床推荐剂量。

参考文献:

[1] 罗玉均, 张桂红, 徐小芹, 等. 免疫增强剂的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2005, 30(6): 7-8.
 [2] 高峰. 中药免疫增强剂作用机理的研究进展[J]. 中兽医学杂志, 2007(2): 41.
 [3] 张鹏. 动物免疫增强剂的研究与应用[J]. 现代畜牧兽医, 2007(4): 51.

[4] 胡元亮, 周新民, 陈玉库, 等. 芪蓝抗毒预防鸡传染性法氏囊病和增强免疫作用的实验研究[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(7): 3-5.
 [5] 孙月平, 王金宝, 张乐萃, 等. 黄芪多糖对免疫抑制鸡某些免疫指标影响的研究[J]. 莱阳农学院学报, 1999, 16(1): 61-63.
 [6] 张运涛, 谷文英. 酵母多糖对蛋用雏鸡免疫器官生长发育的影响[J]. 饲料研究, 1999, 4(10): 4-5.
 [7] 程相朝, 张春杰, 李银聚, 等. 中药免疫增强剂对肉仔鸡免疫器官生长发育及免疫活性细胞影响的研究[J]. 中兽医学杂志, 2002(3): 6-8.
 [8] 王金宝, 张乐萃, 张宗敏, 等. 复方中药多糖对鸡血液白细胞淋巴细胞数量影响的研究[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(1): 64-68.
 [9] 陈春林, 曹国文, 周淑兰, 等. 复合免疫增强剂对肉仔鸡免疫指标及抗病力的影响[J]. 中兽医学杂志, 2005, (5): 4-5.
 [10] 李正本, 高桂生, 史秋梅, 等. 中草药免疫增强剂对鸡白细胞数量的影响[J]. 河南农业科学, 2006, (6): 107-108.
 [11] 王福传, 方昌阁, 张玉换, 等. 复方中草药免疫增强剂对蛋鸡免疫效果的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(2): 187-192.

一例犬落叶天疱疮的诊治

李开江, 田野, 毛新春
(广州致远动物医院, 广东 广州 510000)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)06-0051-02

落叶天疱疮是一种自身免疫性皮肤病,其特征为产生针对表皮细胞膜内及其附近抗原的自身抗体,抗体在细胞间的沉积使最表层的上皮细胞彼此分离(皮肤棘层松解)。落叶天疱疮是犬猫最常见的自身免疫性皮肤病。

原发性病变表现为表皮脓疱。但未破溃的脓疱由于被毛覆盖而不易被发现,它们很脆并极易破溃。继发性病变包括浅表性糜烂、结痂、鳞屑、表皮环状脱皮和脱毛。此病通常最先发生于鼻梁、眼周围和耳廓,并逐渐扩散至全身。鼻部色素减退通常伴有面部病变。皮肤的病变表现为不同程度的瘙痒,并有反复。常见爪垫过度角化,这可能是一些病犬的唯一症状。口腔病变罕见。在犬,粘膜皮肤的病变最轻。在猫可见甲床及乳头周围的病变。并发症有淋巴结肿大、发热、食欲减退和/或精神沉郁。

落叶天疱疮要和寻常天疱疮以及红斑性天疱疮做鉴别诊断。落叶天疱疮,最初表现为头和耳的鳞状,硬皮样,脓疱样皮炎。粘膜以及粘膜皮肤结合处并不显著。常见于脚垫角质化。寻常天疱疮,主要发生于无毛粘膜区域,口腔、肛门、眼结膜、鼻粘膜、阴道、阴茎包皮,以及粘膜皮肤结合处。出现糜烂和溃疡,罕见小囊泡和大疱。寻常天疱疮是最严重的天疱疮,比较罕见。红斑性天疱疮,症状与落叶天疱疮相似,但通常仅局限于头部(耳廓)和面部(鼻梁和眼周围)。偶见脚垫角质化,口腔无变化。

1 病例情况

患犬来自佛山,为中华田园犬,雄性,约1岁,体重15 kg。2012年4月开始发病,发病初期表现为鼻梁周围红疹,脓疱,结痂,痂皮下有大量淡黄色清亮液体渗出。两周之后逐渐扩散至眼周围、耳朵,直至全身发病。被毛逐渐脱落,身上大量的脓性渗出,造成大片毛结在一起,剃毛后,未见新毛长出。饮食大小便正常,精神状态正常,未见其他异常。

该犬曾在犬主家附近的医院就诊,诊断为真菌感染,用真菌一号后全身红疹,痒,掉毛。换一家医院诊断为螨虫感染,使用多拉菌素无效,并且病情越来越严重,出现全身红疹,皮肤破溃,大量黄色结痂,鼻头色素逐渐变淡,部分转为白色(图1),脚垫变硬(图2)。精神逐渐沉郁,四肢无力,只有在大小便和饮食时才愿意站立。



图1 鼻头颜色变浅,鼻梁眼周结痂,红疹脓疱



图2 脚垫角质化

2 临床检查

前肢桡静脉抽血,置离心管中,静置,离心,血清用于检测生化,EDTA抗凝血用于测量血常规。全血生化和血常规检查结果见表1、表2。生化指标出现碱性磷酸酶升高,其他均正常,说明肝肾功能没有异常。血常规可见白细胞严重升高,红细胞降低,血小板轻微升高,表明存在感染状况。

皮肤刮片和抹片经瑞姬氏染色镜检可见大量中性粒细胞、棘层松解细胞(细胞角化、细胞质深染,边缘染色加深),少量球菌(图3)。棘层松解细胞的存在表明此病为落叶天疱疮,同时继发细菌感染。

表1 全血生化结果

项目	单位	检测值	参考值
谷丙转氨酶	IU/L	45	<123
谷草转氨酶	IU/L	21	<41
总胆红素	umol/L	<3	<15
血清尿素	mmol/L	2.5	2.5-9.6
白蛋白	g/L	24	23-40
总蛋白	g/L	70	53-79
葡萄糖	mmol/L	6.9	4.16-6.49
总胆固醇	mmol/L	3.29	2.17-7.42
碱性磷酸酶	IU/L	271	23-212

表2 血常规结果

项目	单位	检测值	参考值
WBC	$10^9/L$	55.4	6-17
RBC	$10^{12}/L$	3.88	5.5-8.5
HGB	g/L	71	120-180
HCT	L/L	0.220	0.37-0.55
MCV	fL	57	60-74
MCH	Pg	18.2	19.5-24.5
MCHC	g/L	322	310-360
PLT	$10^9/L$	660	200-500
MPV	fL	6.8	5-15

3 临床诊断

结合病史、临床症状、皮肤刮片检查结果,诊断为犬落叶天疱疮。

4 治疗情况

4.1 首次用药情况:(1)使用皮脂溢香波洗澡,祛除痂皮,每周2次。(2)口服泼尼松(1 mg/Kg 体重,每天2次),头孢氨苄(22 mg/Kg 体重,每天2次),扑尔敏(1次1粒,每天2次)。

治疗1周后明显好转,全身痂皮逐渐减少,精神状态好转,能够长时间站立,活跃。

4.2 第2周后出现反复,躯干部皮肤出现小的红袍。于是加大剂量泼尼松(2 mg/Kg 体重),同时口服环磷酰胺片,50 mg/次,隔1天用1次。之后病情得到控制,逐渐好转,全身痂皮基本消失,被毛长出,身上伤口逐渐愈合(图4),鼻头恢复黑色(图5)。

治疗第九周后开始减少泼尼松用量,泼尼松用量从2 mg/kg 体重减少到1 mg/kg 体重,直到

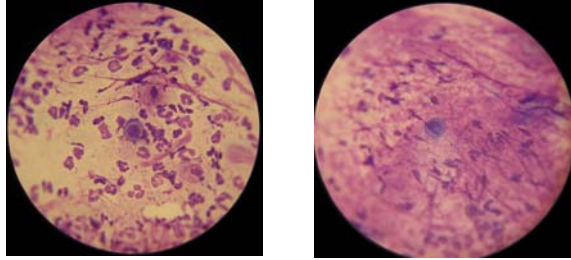


图3 镜下可见棘层松解细胞和少量球菌



图4 身上没有结痂,被毛长出



图5 鼻头颜色开始恢复

停止使用泼尼松,环磷酰胺保持不变。

5 治疗体会

本病会引起患犬局部或者全身形成大量结痂,需要使用相应的洗液去除痂皮。治疗或者预防继发性脓皮症需要全身应用抗生素,直到天疱疮得到控制。同时需要考虑继发真菌和螨虫感染,并且使用相应的药物来控制感染。

口服免疫抑制剂量的泼尼松治疗落叶天疱疮,直到病变得控制和消退,然后逐渐减少用量,直到可以隔日给药的剂量。若开始治疗的2~4周内无法控制病情或者无任何好转,需要增大剂量或者更换免疫抑制药,直到病情控制。如果糖皮质激素无法控制病情,需要使用或者联合使用非类固醇免疫抑制剂,如环磷酰胺。需要长期用药的病例,应该定期检查血象和血生化,以便及时调整治疗方案。

此病预后良好,但是有些病例需要终生使用维持量的药物。

广东畜牧兽医科技 (双月刊)

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

2012年第37卷第1-6期(总第161-166期)

·专题综述·

- 2011年生猪市场回顾及2012年形势展望.....
..... 虞华, 虞丽娜(1-1)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗研究进展.....
..... 钟望, 贺东生(1-6)
- 蓝舌病研究综述..... 翁善钢(1-10)
- 洛克沙肿、阿散酸对蚯蚓和鱼的生态毒理学指标影响
的研究进展..... 赵海燕, 熊文广(1-17)
- 抗氧化剂和微量元素在围产期奶牛免疫中的作用....
..... 杨丰利, 李小杉, 等(1-19)
- 鸚鵡常见DNA病毒性疾病研究综述..... 翁善钢(2-1)
- 兽用联合疫苗的研究进展..... 郭沈涛(2-5)
- 猪圆环病毒2型诊断方法的研究进展..... 李结(2-8)
- 糊化淀粉尿素在反刍动物中应用的研究进展.....
..... 罗佳捷, 张彬, 等(2-11)
- 施马伦贝格病简介..... 郭建红(3-1)
- 非洲猪瘟流行病学最新研究进展..... 翁善钢(3-3)
- 口蹄疫疫苗生产过程质量控制技术的现状与未来.....
..... 谢文强(3-6)
- 发酵床养猪模式的研究进展.... 王卉, 高凤仙(3-11)
- 几种新出现的猪源病毒研究综述..... 翁善钢(4-1)
- 猪瘟活疫苗生产工艺改进现状..... 谢文强(4-5)
- 家禽免疫促进剂的研究进展..... 吴悦赞, 刘佑明(4-8)
- 亚洲主要猪病流行现状..... 翁善钢(5-1)
- 胚胎干细胞的定向诱导分化及其应用前景.....
..... 王士珍, 李雪甫, 等(5-4)
- 酵母硒在奶牛饲养中的应用.....
..... 胡金杰, 占今舜, 等(5-8)
- 中药防治鸭疫里默氏杆菌病的研究进展.....
..... 郑铁锁, 王千菊, 等(5-11)
- 酶联免疫吸附试验在几种犬源人兽共患病检测中的
应用及研究进展..... 贾春玲, 吕殿红, 等(6-1)
- CTX-M型超广谱β-内酰胺酶研究进展.....
..... 冯建昆, 吕婧玉, 等(6-4)
- 家畜繁殖性状基因LHβ的研究进展.....
..... 李杰, 张金波, 等(6-7)
- 犬传染性气管支气管炎相关的呼吸道病毒研究概况..
..... 翁善钢, 陆明辉, 等(6-10)

·畜牧技术·

- 智能型母猪群养管理系统的应用体会.....
..... 颜建中, 冯芳草, 等(1-22)
- 某地区猪病高发原因的调查与对策分析.....
..... 曹长仁, 吴同山(1-24)
- 季节和产蛋周龄对青脚麻鸡种蛋孵化性能的影响....
..... 徐腾, 谢和芳, 等(2-14)

- 中药添加剂对海南文昌鸡免疫功能的影响.....
..... 姚茂忠, 陈湛娟, 等(2-16)
- 湖南浏阳市室外发酵床养猪考察启示.....
..... 赖贻奎, 董闽鲜, 等(2-20)
- 非淀粉多糖复合酶制剂对肉鸡生产性能及养分表现
利用率的影响..... 赵必迁, 张克英, 等(3-15)
- 封开杏花鸡饲养管理技术要点.. 莫薛芳, 冯惠贤(3-20)
- 浅谈笨鸡围栏生态放养..... 张海富(3-24)
- 上半年全国生猪生产形势分析及后期走势判断.....
..... 虞华, 颜艳, 等(4-10)
- 猪场建设与经营的新变化.. 邓淑娟, 罗志锋, 等(4-12)
- 土猪生产发展现状与展望..... 余德谦(5-13)
- 小规模猪场引进种猪情况的调查与分析.....
..... 吴同山, 李岩(5-15)
- 乐昌市梅花猪保种繁育与推广建设.....
..... 黎小芬, 黄智明, 等(6-15)
- 当前我国生猪价格波动情况及后期走势判断.....
..... 虞华, 虞丽娜(6-18)

·兽医临床·

- 猪A型多杀性巴氏杆菌培养基改良的初步探讨.....
..... 吴国胜, 罗镇藩, 等(1-26)
- 高压蒸气灭菌的普通鸡饲料与SPF鸡专用饲料的营养
差异及其对血清果冻样的影响.....
..... 盘伟岚(1-28)
- 含霉菌毒素精糠致猪中毒的病例报告.....
..... 万春云, 江涛, 等(1-30)
- 广东地区鸭黄病毒JM株的分离和初步鉴定.....
..... 苏伟桐, 钟植文, 等(2-23)
- 不同法氏囊病活疫苗对新城疫免疫效果影响的评估
..... 鲁俊鹏, 曾凡桂, 等(2-27)
- 不同抗球虫药物对球虫的敏感性试验.....
..... 巫月生, 齐冬梅, 等(3-27)
- 马链球菌兽疫亚种的保护性抗原SzP蛋白的鉴定与评价
..... 崔健扬(3-30)
- 新城疫LaSota活疫苗对基因VII型分离株的免疫保护
性试验..... 胡北侠, 杨少华, 等(3-34)
- 泰国进口鳄鱼霍乱弧菌药敏试验.....
..... 陈冬娥, 陈冠武, 等(4-15)
- 一起白鸚鵡大肠杆菌病的诊治..... 吴咏梅(4-17)
- 肾康宁对鸡尿酸盐沉积症的治疗效果实验.....
..... 晁利刚, 臧猛(4-18)
- 广州及其周边地区马梨形虫病血清流行病学调查....
..... 沈丹, 薛红, 等(5-17)
- 2012年上半年广东部分猪场猪瘟抗体检测结果分析
与防控对策..... 刘建营, 樊福好(5-20)

广东江门地区鸭新城疫病毒感染的血清学调查.....
冯开容, 钱慧慧, 等(5-22)
 东莞市屠宰场待宰生猪口蹄疫抗体水平的检测与分析..
李小军, 罗卫强, 等(6-19)
 水禽禽流感免疫防控关键技术与措施.....
陈建红, 刘佑明, 等(6-23)
 几例慢性仔猪副伤寒的病理观察.....
聂立欣, 于博(6-27)

·试验研究·

伪狂犬病毒野毒荧光定量PCR检测方法的建立...
田云, 孙彦伟, 等(1-31)
 猪链球菌病C、D、E三价灭活蜂胶疫苗的研制
余玲娜, 黄捷, 等(1-35)
 中草药饲料添加剂“三黄散”对AA肉鸡生产性能的
 影响.....吴建忠, 李绿雄, 等(1-39)
 三个厂家猪瘟活疫苗免疫效果比较试验.....
孙彦伟, 查云峰, 等(2-29)
 鸭瘟病毒UL35基因PCR方法的建立与初步应用...
董嘉文, 孙敏华, 等(2-33)
 维康对肥育猪的饲喂试验...任撑住, 莫道来, 等(2-37)
 H₅亚型禽流感病毒灭活疫苗免疫效果评价试验.....
卢受昇, 孔令辰, 等(2-40)
 四个不同厂家高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)
 免疫效果比较试验.....任裕其, 孙彦伟, 等(3-36)
 一株脱氮细菌的分离鉴定及脱氮活性检测.....
高存川, 张晓慧, 等(3-39)
 四种不同剂量猪瘟活疫苗(传代细胞源)的田间免疫效
 果对比试验.....陈明凯, 姚文凤, 等(3-42)
 广东地区5种优势血清型猪大肠杆菌的外膜蛋白型研究
张丹琳, 王文豪, 等(4-21)
 “增乳健牛散”对小鼠的亚急性毒性试验.....
史秋梅, 高光平, 等(4-24)
 猪口蹄疫O型合成肽疫苗诱导的免疫抗体的监测...
李儒曙, 伍时达, 等(4-27)
 兔病毒性出血症病毒VP60基因真核表达载体的构建
 以及在真核细胞中表达.....张夏兰(4-30)
 氧氟沙星在乌骨鸡体内残留消除规律研究.....
林海丹, 方炳虎, 等(4-33)
 三株脱氮细菌脱氮特性的研究.....
高存川, 张晓慧, 等(5-25)
 ELISA与LC-MS/MS检测喹诺酮类药物残留的比较...
陶光灿, 孙震, 等(5-29)
 副鸡嗜血杆菌(Hpg-8株)培养条件的优化及免疫
 原性的测定.....周燕芬, 银莹, 等(5-34)
 小耳花猪蛔虫ITS及5.8S rDNA序列扩增与分析...
吴晓斌, 张志宏, 等(5-37)
 在免疫抗体压下PRRSV GD株Nsp2和GP5基因变异
 分析.....牛晓芸, 李康宁, 等(6-29)
 猪高致病性蓝耳病弱毒活疫苗免疫试验.....
冯开容, 钱慧慧, 等(6-32)

乳酸锌对蛋鸡生产性能及蛋壳质量的影响试验...
赵必迁, 周安国, 等(6-35)
 芪芍增免散对鸡法氏囊病疫苗免疫增强作用的研究...
刘建伟, 郭莉, 等(6-38)

·华南宠物园地·

两种开胸术法建立犬右心衰模型的对比.....
谭婉虹, 熊惠军(1-41)
 猫鞍状血栓1例.....罗倩怡, 赖孔继, 等(1-44)
 一例猫肠道异物性穿孔的超声诊断.....
吴仲恒, 张盈盈, 等(1-47)
 犬结膜吸吮线虫病1例.....廖新权, 刘领汉, 等(2-44)
 龟泄殖道助产一例.....刘汉斌, 熊惠军(2-47)
 犬淋巴肉瘤的诊疗体会.....邹晓红, 梁英奇(3-44)
 一例宠物雪貂犬瘟热病毒与细小病毒混合感染的诊治
 体会.....谭志文, 周性聪(3-46)
 城市流浪犬猫的成因、危害与对策.....
李嘉雯, 黄群山(4-37)
 一例犬心脏肿瘤的诊治.....罗倩怡, 赵长荣(4-40)
 沈阳某犬场犬皮肤病的药物疗效调查.....孙宁(4-43)
 一例小熊猫尾部外伤化脓感染的手术治疗.....
左珂菁, 植广林, 等(5-40)
 HPLC法测定犬血浆中伊曲康唑浓度.....
李德军, 姜岩, 等(5-42)
 一例犬急性肾功能衰竭的诊疗体会.....
谢究周, 张林玉, 等(5-45)
 一例猫淋巴肉瘤的临床诊治.....
陈义洲, 黄婉婷, 等(6-42)
 豹纹守宫的人工饲养与繁殖.....
胡琳, 李思瑶, 等(6-47)
 一例犬落叶天疱疮的诊治...李开江, 田野, 等(6-51)

·经验交流·

广东肇庆“猪-沼-果”生态健康养殖发展与成效...
岑兴洪, 钟建桥(1-49)
 山羊疥螨病的诊治.....王兵(1-52)
 浅谈动物疫苗接种的注意事项...张志宏, 梁英华(2-49)
 当前蛋价持续下跌原因分析及后期走势判断.....
虞华, 陈光亚, 等(2-51)
 浅谈如何开展兽医流行病学的问卷调查.....
陈平洁, 宋长绪, 等(3-48)
 当前豆粕价格陡涨原因分析及后期走势判断.....
虞华, 虞丽娜(3-51)
 新形势下高校生产实习质量保证体系研究.....
剡海阔, 陈晓梅, 等(4-47)
 浅析社会化手段在犬类狂犬病免疫工作中的应用...
洪泽武(4-51)
 纯种后备母猪不发情的原因与对策.....
潘新尤, 黄如渠, 等(5-48)
 2012年美国种猪场考察报告.....
陈清森, 张从林, 等(5-51)