

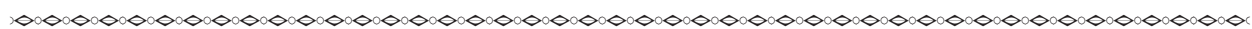
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2011 Volume 36,Number 2 (Total No.156)

Main Content

- Research progress on multi-epitope genetically engineered vaccine* He Ling, Chen Rui'ai, et al (3)
- Application of functional oligosaccharides in animal production*Luo Jiajie, Zhang Bin, et al (6)
- Effect of chitosan, a mucosal adjuvant on the mucosal immunity*Shi Xiumin, Zhao Zhongpeng, et al(9)
- Effect of different additives on the fermentation quality of alfalfa silage*.....
..... Chen Luliang, Li Jing(11)
- Effect of PUFA supplementation in the sheep semen diluent on frozen semen quality*.....
.....Yang Jian, Wang Lifang, et al(15)
- Influence of superovulation on growth of early rabbit embryos in vitro*.....Cao Jun-Jun(18)
- Prevention and control of streptococcus disease in pigs during the quarantine period*.....
.....Kang Wei (21)
- Sensory identification of physical bleeding and pathological bleeding of tissues and organs of slaughtered
pigs*Liang Mushou (24)
- Establishment of RT-LAMP method for detection of CSFV*Zhao Mingqiu, Wang Weifang,et al(26)
- Agglutination test for detection of the serum antibody of Lancefield group D Streptococcus*.....
..... Guo Shentao,Situ Jianmou,et al(29)
- Influence of different antigens on the detection of antibodies against H₅ subtype influenza*.....
.....Lu Shousheng, Kong Lingchen, et al (33)
- ELISA method for the detection of antibodies against H9 subtype influenza with HA1 protein as the
antigen*.....Ling Chuanhua, Luo Yingjiao, et al(36)
- Dystocia in small-sized dogs*.....Chen Hainan, Huang Qunshan(40)
- Administration on artificial insemination in large scale pig farms*.....Zhang Xin, Cui Min(47)
- Comprehensive utilization of pig manure and suggestions*.....Wu Xingfang(49)



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

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

Chief Editor:JIANG 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

多表位基因工程疫苗的研究进展

何玲¹, 陈瑞爱¹, 罗满林^{1,2}, 裴仇福¹

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 新兴 527400; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510000)

摘要: 多表位基因工程疫苗是运用重组 DNA 技术将多个编码抗原表位的 DNA 序列片段进行串联组合, 然后重组入原核、真核表达载体或者病毒构建重组子, 并进一步表达重组蛋白而制成的疫苗。多表位基因工程疫苗是最具开发前景的疫苗之一, 在细菌、病毒、寄生虫等新型疫苗的研究中取得了很大的进步。本文就多表位基因工程疫苗的研究进行综述。

关键词: 抗原表位; 基因工程; 疫苗

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0003-03

多表位疫苗(multi-epitope vaccine)是指同时携带多个目标抗原以及辅助性表位的疫苗^[1]。多表位基因工程疫苗是运用重组 DNA 技术将多个编码抗原表位的 DNA 序列片段进行串联组合, 然后重组入载体而制备的, 包括重组蛋白疫苗、核酸疫苗和活载体疫苗。多表位疫苗可以是针对一种病原的具有多重免疫保护作用的多价疫苗, 也可是能预防多种疾病的广谱疫苗。多表位基因工程疫苗已成为当前疫苗研究的热门课题和前沿技术^[2,3]。

1 多表位基因工程疫苗的研究

1.1 抗原表位的预测筛选 表位(epitope)是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团, 是抗原中能被免疫细胞特异性识别的线性片段或空间构象性结构, 包括 T 细胞表位和 B 细胞表位。T 细胞表位是抗原提呈细胞(APC)加工提呈的抗原肽, 呈线性排列; B 细胞表位位于分子的表面或转折处, 为构象决定基或顺序决定基。构建多表位疫苗的首要问题是如何准确预测和筛选有效的特异性抗原表位。2000年, Hagmann^[4]在《Science》上率先提出了“计算机辅助疫苗设计”的新概念, 其主要原理是采用计算机软件分析蛋白质结构, 模拟天然蛋白构象, 筛选出有价值的结构域或 DNA 片段, 用于药物靶点筛选、抗原表位设计等。对于 T 细胞表位的筛选要借助预测 T 细胞表位的相关软件, 预测与 MHC 分子结合的短肽。B 细胞表位的预测

是根据已有的表位数据资料, 通过计算机软件对序列进行分析, 需要综合考虑序列的亲水性、电荷分布、可及性、可塑性及抗原性等性质^[5], 对预测出的抗原表位要进行综合评价, 筛选出具有针对性和特异性的候选抗原表位。

1.2 多抗原表位的选择 B 细胞表位诱导机体产生体液免疫反应, T 细胞表位则诱导 CTL 效应。为了提高机体的免疫保护水平, 可以选择多个 B 细胞表位和 T 细胞表位, 同时诱导特异的体液免疫和细胞免疫, 充分发挥预防控制作用。可以选择抗原分子的特异性的保守序列, 从而提供不同毒株之间的交叉免疫保护, 这可能是预防具有多血清型(如副猪嗜血杆菌)及高突变率病原(如禽流感病毒)感染的有效途径。可以选择同一病原体的多种抗原表位, 研制具有多重免疫保护作用的多价疫苗, 也可选择来自不同病原体的多种抗原表位, 研制可以预防多种疾病的广谱疫苗。

1.3 多表位基因工程疫苗的设计 为了充分发挥多个抗原表位的功能, 需要对表位进行合理的串联组合, 设计合理的多表位疫苗结构。为了避免一些构象表位在空间结构上的相互干扰, 可以对多表位基因进行修饰, 例如添加通用性细胞表位、N 端信号肽引导序列等, 还可以在表位之间添加柔性氨基酸序列^[6]。构建多表位基因工程疫苗关键把握四个方面: ①确保各表位基因之间的优化组合与合理连接; ②确保每个编码抗原表位的基

因序列可被正确阅读、翻译和有效终止;③选择合适的表达载体;④选择安全高效的免疫佐剂。

2 多表位基因工程疫苗的研究及应用

2.1 多表位重组疫苗 阳泰等^[7]选用 IBV 的 S1、S2、N 结构蛋白上的高度保守的两个 B 细胞表位 (SP3245-160, SP7566-584) 和一个 T 细胞表位 (NP167-83), 并使 T 细胞表位位于 B 细胞表位的 N 端, 设计了复合多表位基因 (EpiA), 采用基因工程方法, 将 EpiA 在大肠杆菌得以表达、纯化。ELISA 和 Western blot 法证明所表达的融合蛋白能与标准 IBV 阳性血清产生特异性抗原-抗体反应, 能有效激发鸡体特异性体液和细胞免疫; 与对照组差异极显著 ($P \leq 0.01$); 攻毒试验表明, 该多表位疫苗保护率达到 73%。Wang 等^[8]将 IBDV 的 5 个抗原表位用 GGGs 四肽连接构建多表位基因 5epis, 构建原核表达质粒 pET-5epis 后, 在大肠杆菌中表达重组蛋白 r5EPIS。用 IBDV 单克隆抗体和多克隆抗体对 r5EPIS 进行免疫印迹对比分析, 结果表明 r5EPIS 具有 IBDV 特异性和免疫反应性。用 r5EPIS 加免疫佐剂经肌肉注射免疫鸡, 免疫 2 次后, 血清抗体效价可达到 1:12 800; 用 200 个 ELD50IBDV 超强毒株 GX8/99 攻击实验鸡, r5EPIS 免疫组全部存活, 而单用佐剂对照组的死亡率为 86.7% (13/15), 证明 r5EPIS 可诱导机体产生抗 IBDV 感染的保护性免疫应答。

Du 等^[9]用腺病毒表达系统分别表达了口蹄疫病毒多表位重组蛋白 (结构蛋白 VP1 第 21-60 位、141-160 位和 200-213 位氨基酸)、猪 α 干扰素和猪 α -干扰素偶联口蹄疫多表位重组蛋白抗原, 并通过豚鼠和猪对其免疫原性进行评价。结果显示, 偶联猪 α -干扰素的多表位重组蛋白抗原引起体液免疫和细胞免疫的能力最强; 用同源病毒攻击免疫动物, 获得 100% 保护。Kreutz 等^[10]用杆状病毒表达 PRRSV GP5 和 GP6, 初步试验表明重组蛋白具有免疫原性。Persch 等报道用杆状病毒分别表达的 PRRSV E 蛋白和 GP3 接种猪后, 可检测出抗 PRRSV 的中和抗体; 而用杆状病毒表达重组的 GP3-E 蛋白可获得最强的免疫保护作用^[11]。

2.2 多表位核酸疫苗 韩松等^[12]构建了含有 PRRSV 主要结构蛋白基因 ORF5、ORF6 和 PCV2 衣壳蛋白基因 ORF2 基因的多表位重组质粒 p1RES-ORF2-

ORF5m-ORF6a, 用壳聚糖对该质粒进行包裹, 通过豚鼠和猪对其免疫效果进行评价。结果重组质粒能刺激机体产生 PRRSV、PCV2 特异性抗体和中和抗体; 特异性 T 淋巴细胞增殖、 CD_4^+ / CD_8^+ 阳性细胞比例上升、IFN- γ 和 IL-2 分泌水平提高, 表明该重组核酸疫苗主要刺激介导 Th1 类免疫反应。攻毒实验证明核酸疫苗免疫对实验猪起到明显的保护作用; 病理学检测结果可以看出, 重组核酸疫苗免疫组未出现或仅出现轻微变化, 组织器官的损伤程度较轻。

于钦磊等^[13]选择隐孢子虫基因组中编码表面蛋白的 CP12 和 CP21 基因构建多表位 DNA 疫苗质粒: pVAXI-CP12b-CP21b、pVAXI-C-CP12-CP21b, 通过 BALB/c 小鼠评价其免疫保护效果, 结果重组质粒免疫鼠的 CD_4^+ T 淋巴细胞数和 CD_4^+ / CD_8^+ T 淋巴细胞数的比例与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。攻毒试验表明, 重组质粒免疫组排卵囊数明显减少, 排卵囊持续时间平均缩短 3~4 d, 最佳排卵囊减少率达到 84.1%。将 pVAXI-C-CP12-CP21b 质粒经鼻粘膜接种妊娠山羊, 母羊 IgG 和 IgA 抗体滴度逐渐增加, 攻虫后卵囊排出量减少、排出时间缩短, 并且母羊能够将免疫保护力传给后代。表现在后代每天排出卵囊数量明显减少, 排卵囊持续时间较短 (试验组 12.5 ± 1.13 d, 对照组 14 ± 1.27 d)。

田浪等^[14]利用计算机软件分析筛选出鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 结构蛋白基因 S1、S2、N 基因的 T、B 细胞的优势抗原表位共 7 段, 采用人工合成及 PCR 方法将各抗原表位以柔性氨基酸 (GP/GA) 作为接头串联成一条全新的多表位嵌合基因 F, 并定向克隆入真核表达质粒 pVAX1。阳性质粒 pVAX-F 通过脂质体转染 COS-7 细胞, 提取转染细胞总 RNA, RT-PCR 方法检测到目的基因的转录; 间接免疫荧光试验 (IFA) 检测到特异性荧光存在。表明表达产物能与相应抗体特异性结合, 具有一定的生物学活性和抗原性, 有望成为抗 IBV 的核酸疫苗。

2.3 多表位活载体疫苗 Jiang 等^[15]构建了表达 PRRSV GP5 和 M 融合蛋白的重组伪狂犬病毒 rPRV-GP5m-M, 用 PRV 进行小鼠攻毒能够提供完全保护, 并且产生了高水平的 PRV 特异性中和抗体和淋巴细胞增殖反应; 用重组疫苗 rPRV-GP5m-M 免疫猪产生了 PRRSV 特异性中和抗体和高水平的

淋巴细胞增殖; 用重组疫苗免疫猪体温变化不明显, 出现短期的病毒血症, 在组织中的病毒含量较低。表明重组疫苗 rPRV-GP5m-M 对预防 PRV 和 PRRSV 感染可能是一个比较理想的候选疫苗。Jiang 等^[6]以腺病毒为载体, 分别构建了表达 PRRSV ORF5、ORF6、ORF5/ORF6 的重组腺病毒 rAd-GP5, rAd-M 和 rAd-M-GP5。小鼠免疫试验结果表明, 免疫后 4 周小鼠产生了 PRRSV 特异性抗体和细胞免疫反应, 并且表达 M-GP5 融合蛋白的 rAd-M-GP5 免疫组小鼠产生的中和抗体水平、淋巴细胞增殖反应以及 PRRSV 特异性的 CTL 反应均显著高于 rAd-M 和 rAd-GP5 免疫组。

马鸣潇等^[17]筛选 O 型、A 型和 Asia 1 型 FMDV 复合多表位免疫原基因 OAAT, 将其与猪 IL-18 基因共表达的重组鸡痘病毒 (Recombinant fowlpox virus, R-FPV) 重组, 用所构建的重组活病毒 vUTA-IL18-OAAT 免疫小鼠, 并检测了 CTL 杀伤活性、特异性抗体水平等指标。结果显示, 重组病毒免疫组的各项免疫指标与对照组相比都显著上升 ($P < 0.05$)。表明构建的重组鸡痘病毒能够在体外表达目的蛋白, 且能有效刺激小鼠产生特异的体液免疫和细胞免疫应答。

3 展望

多表位基因工程疫苗具有较高的研究和应用价值, 但其仍然存在一些问题: 表位的预测及筛选方法有待进一步改进和完善; 表位的合理优化和排列组合规律并不清晰, 需摸索其最佳组合连接方式; 需克服因基因限制性而导致的免疫逃避或免疫失败问题; 还有如何选择安全高效的免疫佐剂等等。相信随着科学的发展, 这些问题会逐步得到解决。总之, 多表位基因工程疫苗安全、高效, 而且更适合多价疫苗以及联合疫苗的开发研究, 这些优点符合未来疫苗研究的发展方向, 具有广阔的开发应用前景。

参考文献:

[1] 张有峰, 王红宁, 黄勇, 等. 多表位疫苗的构建策略及其在动物疫苗中的应用[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(2): 29-33.
[2] Paul S, Piontkivska H. Discovery of novel targets for multi-epitope vaccines: screening of HIV-1 genomes using association rule mining[J]. *Retrovirology*,

2009, (6): 62-72.
[3] Li P, Cao R B, Zheng Q S, et al. Enhancement of humoral and cellular immunity in mice against Japanese encephalitis virus using a DNA prime-protein boost vaccine strategy[J]. *Vet J*, 2010, 183(2): 210-216.
[4] Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, et al. The virosome concept for influenza vaccines[J]. *Vaccine*, 2005, 8(23): S26-38.
[5] Brusic V, Bajic V B, Petrovsky N. Computational methods for prediction of T2cell epitopes—a framework for modeling, testing, and applications[J]. *Methods*, 2004, 34(4): 436-443.
[6] 刘惠莉, 潘洁, 赵艳敏, 等. 猪流感病毒表位抗原设计与串联表达策略[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007, (6): 44-45.
[7] 阳泰, 王红宁, 汪雪, 等. 抗禽传染性支气管炎病毒多肽疫苗 EpiA 免疫原性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(3): 20-24.
[8] Wang Y S, Fan H J, Li Y, et al. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus[J]. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4447-4455.
[9] Du Y, Li Y, He H, et al. Enhanced immunogenicity of multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus fused with porcine interferon- α in mice and protective efficacy in guinea pigs and swine[J]. *Virology Methods*, 2008, 149(1): 144-152.
[10] Kreutz L C, Mengeling W L. Baculovirus expression and immunological detection Of the major structural Proteins of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Microbiol*, 1997, 59(1): 1-13.
[11] 刘丽霞, 沈国顺. 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(10): 55-57.
[12] 韩松. PRRSV、PCV2 二联基因工程疫苗的构建及实验免疫研究[D]. 吉林长春: 军事医学科学院, 2009.
[13] 于钦磊. 隐孢子虫 CP12/CP21 二价核酸疫苗的研究[D]. 吉林长春: 吉林大学, 2008.
[14] 田浪, 王红宁, 鲁丹, 等. 鸡传染性支气管炎病毒多表位核酸疫苗的构建和表达[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(6): 691-695.
[15] Jiang P, Jiang W M, Li Y F, et al. Humoral immune response induced by oral Administration of S. typhimurium containing a DNA vaccine against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102: 321-328.
[16] Wenming Jiang, Ping Jiang, Xianwei Wang, et al. Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and or GP4 of PRRS virus[J]. *Virus Research*, 2008, 136: 50-57.
[17] 马鸣潇, 金宁一, 刘慧娟, 等. 口蹄疫三价重组鸡痘病毒疫苗分子设计及其构建[J]. 高技术通讯, 2007, 17(3): 288-291.

功能性寡糖在动物生产中的应用研究进展

罗佳捷¹, 张彬¹, 王洁²

(1. 湖南农业大学经济动物研究所, 湖南长沙 410128; 2. 长沙市动物防疫监督站, 湖南长沙 410013)

摘要: 本文从功能性寡糖的定义及种类、生物学功能、在动物生产中的应用和影响其应用效果的因素等方面对其进行了综述, 并展望了它的应用前景。

关键词: 功能性寡糖; 生物学功能; 动物生产; 抗生素

中图分类号: S816.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0006-03

随着养殖业向绿色、环保、无公害方向不断发展, 使用抗生素添加剂所产生的药物残留、耐药性和降低动物产品品质等问题带来了不良的社会影响, 甚至威胁到人类的健康。因此, 抗生素逐渐被许多国家明令禁止在动物饲料中添加应用, 人们开始不断地寻求和开发健康、无公害的绿色饲料添加剂来作为抗生素的替代品。在此过程中, 人们发现一些功能性寡糖能选择性刺激肠道有益菌群的增殖, 而不被有害菌利用, 对维持动物健康生长十分有利。随着饲料生物技术和微生物学理论的发展, 功能性低聚糖因其优良的特性及生理功能, 正受到人们日益广泛的关注, 成为能够有效替代抗生素的潜在资源。本文从功能性寡糖的定义及种类、生物学功能、在动物生产中的应用和影响其应用效果的因素等方面进行了综述, 并对其应用前景作出了展望。

1 功能性寡糖的定义及种类

功能性寡糖又称功能性低聚糖, 是指具有特殊生物学功能的由2~10个单糖分子以糖苷键连接而成的小聚合物。单糖分子种类很多, 部分功能性寡糖由于单糖分子结合位置及结合类型的特殊性, 不能被单胃动物分泌的酶水解消化, 可作为饲料添加剂使用。目前, 已经发现的具有特殊生理功能的功能性寡糖有十多种, 其中被用作饲料添加剂的有大豆寡糖、木寡糖、果寡糖、甘露寡糖、异麦芽寡糖、壳寡糖、半乳甘露寡糖、海洋寡糖和乳寡糖等。在动物饲料中添加适量的功能性寡糖, 具有调节动物胃肠道区系、提高动物机体免疫功能、降低动物患病几率、改善动物生产性能和减少动物粪便中氨气等腐败物质数量等功能。功能性寡糖具有耐热、稳定、无污染和无残留等特点, 是一种

新型的绿色饲料添加剂^[1]。

2 功能性寡糖的生物学功能

2.1 调节动物肠道微生物区系 正常情况下, 动物肠道内的有益菌群和有害菌群相互制约、相互依赖, 处于一种动态的平衡。在应激条件下, 正常的平衡被打破, 有害菌群大量增殖成为优势菌群, 从而影响动物的健康。功能性寡糖进入动物肠道后, 能被其中的有益菌充分分解利用, 产生大量的VFA供双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌群利用而使其迅速增殖; 同时, 功能性寡糖的分解能产生一些抗菌类物质及下调肠道pH值, 从而有效抑制大肠杆菌和沙门氏菌等有害菌的生长, 最终使有益菌群在动物肠道微生物区系中占据主导地位, 维持动物的健康生长。

2.2 影响胃肠道组织结构 功能性寡糖能促进动物肠道内有益菌的大量增殖, 而有益菌代谢产生的丙酸是黏膜代谢的主要能源物质。它具有促进正常细胞形成的作用。因此, 摄入一定量的功能性寡糖能显著增加猪、禽的肠绒毛高度和肠壁厚度。

2.3 提高动物机体免疫力 功能性寡糖可充当免疫刺激因子, 提高药物或抗原免疫应答能力。还能作为外源性的抗原佐剂, 与某些病毒和毒素结合, 减缓抗原吸收, 增加抗原效价。功能性寡糖还能促进动物肠道内双歧杆菌的增殖, 而双歧杆菌可以诱导免疫反应, 增强动物机体的免疫能力。双歧杆菌从功能性寡糖获得营养后, 其数量增多, 杀菌能力大大增强。进入动物体的病毒和病菌大部分会被双歧杆菌杀死, 还有一部分会随着粪便及时排除动物体外。此外, 部分功能性寡糖还能激活T细胞, 被激活后的T细胞所分泌的细胞因子又能激活各种效应细胞群体, 活化的TH细胞分泌的

IL-4 能促进 B 细胞的活化、增殖与分化,使分泌抗体的数量增多,从而提高动物机体免疫力。

2.4 改善动物生产性能 功能性寡糖改善动物生产性能是其多种生物学功能的共同作用结果。首先,功能性寡糖使动物肠道有益菌增加,调节了肠道菌群平衡,增强了动物机体免疫力,从而减低动物患病风险,使动物能够健康的生长;其次,功能性寡糖使动物肠道绒毛高度增加,使动物肠道总的吸收面积扩大,促进了动物对营养物质的吸收;另外,功能性寡糖还可以使乳糖转化为乳酸,通过调节肠道 pH 和结肠发酵能力起到改善消化的作用,进而提高各种营养素的利用率。增殖的双歧杆菌能自身合成或促进合成维生素 B₁, 维生素 B₆、维生素 B₁₂、烟酸和叶酸等,还能通过抑制某些维生素分解菌来保障维生素的供应。功能性寡糖还能促进钙离子的吸收。通过这些作用机制,功能性寡糖便可以有效的改善动物生产性能。

3 功能性寡糖在动物生产中的应用

3.1 功能性寡糖在家禽生产中的应用 罗佳捷^[2]研究发现,在樱桃谷肉鸭基础日粮中添加 500 mg/kg 大豆寡糖能显著改善肉鸭的生产性能,并能显著增加肉鸭盲肠内乳酸杆菌和双歧杆菌的数量,减少大肠杆菌的数量。张建斌等^[3]在蛋雏鸡基础日粮中添加 0.3% 大豆寡糖,发现蛋雏鸡的生产性能得到显著的改善,且盲肠和回肠内容物中的双歧杆菌及乳酸杆菌数量显著增加,大肠杆菌数量显著减少。Sohail 等^[4]研究发现甘露寡糖可以减轻肉鸡的热应激伤害。甘露寡糖的添加降低了血清中皮质醇和胆固醇含量,提高了甲状腺素浓度,并改善了肉鸡在热应激条件下对新城疫病毒的体液免疫。Li 等^[5]研究发现,100 mg/kg 甲壳寡糖可以有效改善肉鸡的生产性能,提高 DM、钙和磷的消化率,增加排泄物中乳酸菌的数量,减少大肠杆菌数量并降低血清甘油三酯和总胆固醇浓度。Jung 等^[6]通过在肉鸡基础日粮中添加半乳寡糖发现,肉鸡粪便中乳酸杆菌和双歧杆菌的数量有了显著提高。Baurhoo 等^[7]也通过研究发现甘露寡糖可以增加肉鸡空肠绒毛高度和绒毛上的杯状细胞数量,并增加了粪便中双歧杆菌的数量,减少了大肠杆菌的数量。

3.2 功能性寡糖在养猪生产中的应用 陈代文等^[8]研究发现,在断奶仔猪基础日粮中添加 0.1% 水平的寡糖能极显著提高血液 IgG 水平和淋巴细

胞转化率,并能有效提高仔猪粪便中双歧杆菌和乳酸杆菌数量,降低大肠杆菌数量。Baker 等^[9]通过研究发现,大豆寡糖能够提高生长猪异亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸和苏氨酸的回肠消化率,还能提高日粮中多种必需氨基酸的浓度。Liu 等^[10]在断奶仔猪基础日粮中添加甲壳寡糖 200 mg/kg,发现断奶仔猪的生长性能得到明显改善,DM、GE、粗蛋白、粗脂肪、钙和磷的表观消化率有了明显提高,并减少了腹泻的发生,增加了空肠与回肠中的绒毛高度,还增加了粪便中乳酸杆菌的数量,减少了大肠杆菌数量。李兆勇等^[11]在仔猪基础日粮中添加 200 g/t 木寡糖,发现仔猪的饲料转化率及仔猪十二指肠、空肠胰蛋白酶、胃蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的活性显著提高,并能显著提高仔猪对 DM 和 GE 的表观消化率。

3.3 功能性寡糖在反刍动物生产中的应用 张学峰等^[12,13]给绵羊瘤胃灌注占干物质采食量 0.6% 和 1.2% 水平的大豆寡糖,发现其能有效提高瘤胃纤维分解菌的数量,降低甲烷产生菌的数量,改善绵羊瘤胃微生物区系。此外还提高了瘤胃液相食糜流通率、瘤胃食糜氮流通量、瘤胃微生物氮和十二指肠 MN 流通量,提高了 DM、OM、ADF、NDF 在整个消化道的消化率和 CP 在小肠中的消化率。凌宝明等^[14]利用体外法研究表明,异麦芽寡糖可以增加绵羊瘤胃中 VFA 含量和降低氨态氮含量,而甘露寡糖和果寡糖可以增加绵羊瘤胃中 VFA 和 BCP 含量及降低氨态氮含量。王新峰等^[15]研究发现,异麦芽寡糖和果寡糖能改变断奶羔羊瘤胃菌群结构,果寡糖能明显提高瘤胃总菌、黄化瘤胃球菌及琥珀酸丝状杆菌的数量。瞿明仁等^[16]在绵羊消化道不同部位灌注大豆寡糖,发现绵羊外周血 CD₄ 数量、CD₄/CD₈ 值、血清 IgG 和 IgA 含量有一定程度的提高,说明大豆寡糖在一定程度上提高绵羊的免疫功能。

3.4 功能性寡糖在水产养殖中的应用 周传朋等^[17]在异育银鲫基础日粮中添加 0.2% 寡糖和中草药复合物,发现异育银鲫的增重率、特定增长率、血清溶菌酶活性、血液葡萄糖含量和超氧化物歧化酶活性得到显著提高,而谷丙转氨酶活性、谷丙转氨酶 / 谷草转氨酶活性比值则显著降低。Dimitroglou 等^[18]研究发现,0.2% 甘露寡糖可以增加虹鳟鱼肠道吸收表面积和微绒毛的长度及密度,并且能显著的减少虹鳟鱼肠道内弧菌属细菌

的数量。肖明松等^[19]在中华鳖幼鳖日粮中添加果寡糖和糖萜素的正交试验表明, 随着添加水平的提高, 粗蛋白质及钙、磷的表现消化率得到显著提高, 而粪便中氮、磷、钙的含量则显著降低, 幼鳖的平均日增重显著增加, 饲料系数显著降低。

4 影响功能性寡糖应用效果的因素

功能性寡糖应用在动物生产中收到了良好的成效, 但也有很多因素影响其应用效果: (1) 使用剂量: 剂量必须合适, 剂量过低起不到明显的效果, 而剂量过高则不但增加成本还可能对动物产生不利的影响; (2) 动物的种类和年龄: 动物种类不同, 消化道结构有很大差异, 功能性寡糖的应用效果亦会受到影响。同种动物在不同阶段肠道菌群组成的差异很大, 这也会对功能性寡糖的应用效果产生影响; (3) 日粮组成: 有些饲料原料中含有天然寡糖, 且差异很大, 这也是在添加功能性寡糖时应注意到的因素; (4) 与益生菌的协同作用: 功能性寡糖与益生菌能相互促进、相互补充、彼此增效, 联合使用效果更佳。

5 结语

随着我国畜牧业的迅速发展并向着绿色、环保和无公害的方向进行转变, 具有严重毒副作用的抗生素将逐步淡出现代畜牧生产, 酶制剂、酸制剂、合生素、功能性寡糖等一些健康、无公害的绿色添加剂应运而生, 成为了抗生素添加剂的潜在替代品。功能性寡糖具有优良的生物学功能, 如改善动物肠道微生物群落结构、增强动物机体免疫力、改善动物消化道形态及维持动物健康生长。目前, 功能性寡糖已经被越来越广泛地应用于动物生产中, 并取得了良好的效果。相信随着广大科技工作者的共同努力和研究, 功能性寡糖必将为畜牧业的发展贡献更大的力量。

参考文献:

- [1] 陈立华. 饲料添加剂的新丁——寡糖[J]. 新农业, 2010, (3): 30.
- [2] 罗佳捷. 大豆低聚糖对樱桃谷鸭肠道微生物群落结构影响的动态学研究[D]. 湖南农业大学: 硕士生学位论文, 2010.
- [3] 张建斌, 车向荣, 杨华. 大豆寡糖替代抗生素对蛋雏鸡生产性能和肠道菌群的影响[J]. 饲料工业, 2010, 31(10): 7-9.
- [4] Sohail M, Ijaz A, Yousaf M, et al. Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and Lactobacillus-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity[J]. *Poult Sci*, 2010, 89: 1934-1938.
- [5] Li X J, Piao X S, Kim S W, et al. Effects of Chito-Oligosaccharide Supplementation on Performance, Nutrient Digestibility, and Serum Composition in Broiler Chickens[J]. *Poult Sci*, 2007, 86: 1107-1114.
- [6] Jung S, Houde R, Baurhoo B, et al. Effects of Galacto-Oligosaccharides and a Bifidobacteria lactis-Based Probiotic Strain on the Growth Performance and Fecal Microflora of Broiler Chickens[J]. *Poult Sci*, 2008, 87: 1694-1699.
- [7] Baurhoo B, Phillip L, Ruiz F. Effects of Purified Lignin and Mannan Oligosaccharides on Intestinal Integrity and Microbial Populations in the Ceca and Litter of Broiler Chickens[J]. *Poult Sci*, 2007, 86: 1070-1078.
- [8] 陈代文, 张克英, 王万祥, 等. 酸化剂、益生菌和寡糖对断奶仔猪粪中微生物菌群和免疫功能的影响及其互作效应的研究[J]. *动物营养学报*, 2006, 18(3): 172-178.
- [9] Baker K, Stein H. Amino acid digestibility and concentration of digestible and metabolizable energy in soybean meal produced from conventional, high-protein, or low-oligosaccharide varieties of soybeans and fed to growing pigs[J]. *J Anim Sci*, 2009, 87: 2282-2290.
- [10] Liu P, Piao X S, Kim S W, et al. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs[J]. *J Anim Sci*, 2008, 86: 2609-2618.
- [11] 李兆勇, 杨在宾, 杨维仁, 等. 益生菌和低聚木糖对仔猪生长和养分消化性能的影响[J]. *西北农林大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(1): 59-65.
- [12] 张学峰, 瞿明仁, 王立阁, 等. 大豆寡糖对瘤胃微生物区系的影响[J]. *动物营养学报*, 2008, 20(3): 355-359.
- [13] 刘兵, 瞿明仁, 张学峰, 等. 瘤胃灌注大豆寡糖对绵羊消化道内营养物质流通与消化的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 915-922.
- [14] 凌宝明, 瞿明仁, 卢德勋, 等. 利用体外法研究功能性寡糖对生长绵羊瘤胃发酵特性的影响[J]. *动物营养学报*, 2007, 19(2): 129-134.
- [15] 王新峰, 冷青文, 李志远, 等. 低聚糖对断奶羔羊瘤胃菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(5): 1396-1401.
- [16] 瞿明仁, 刘兵, 张学峰, 等. 消化道不同部位灌注大豆寡糖对绵羊几个免疫指标影响[J]. *动物营养学报*, 2007, 19(6): 678-683.
- [17] 周传朋, 刘波, 王广宇, 等. 寡糖-中草药复合物和黄霉素对异育银鲫生长、免疫及抗病力的影响[J]. *淡水渔业*, 2009, 39(3): 46-51.
- [18] Dimitroglou A, Merrifield D, Moate R, et al. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87: 3226-3234.
- [19] 肖明松, 王志耕, 崔峰, 等. 果寡糖与糖萜素对中华鳖生长性能影响的正交试验[J]. *淡水渔业*, 2004, 34(3): 13-15.

壳聚糖黏膜佐剂促进黏膜免疫的研究进展

师秀敏¹, 赵忠鹏^{1,2}, 闫芳¹, 王希良²

(1. 山西农业大学动物科技学院, 山西 太谷 030801; 2. 军事医学科学院微生物与流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

摘要:近年来通过黏膜部位释放抗原物质的新型免疫方法受到了越来越多的关注, 其中鼻腔免疫被认为是最有前景的给药途径, 佐剂可以提高或优化对通过黏膜或系统途径接种抗原的免疫应答, 新的黏膜佐剂和传递系统是疫苗领域的研究热点。本文就纳米载体-壳聚糖作为特殊的黏膜免疫佐剂和 PEG 交联壳聚糖季铵盐智能水凝胶体系作为新型的鼻腔免疫传递系统作一综述。

关键词: 黏膜佐剂; 免疫

中图分类号: S852.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0009-02

目前, 疫苗的研究主要集中在如何提高接种的效率、简化免疫途径、保证疫苗的安全性及稳定性等方面。传统的免疫方式操作较复杂, 抗原用量大, 且要使用针头这一潜在的感染源, 容易引起局部的炎症反应。鼻腔免疫简单方便, 无痛, 能避免针头感染, 适合大量人群的免疫以及新生婴儿的免疫接种。但现有鼻黏膜免疫体系免疫效果较差、疫苗生物利用度低。因此, 黏膜佐剂和传递系统被认为是疫苗的重要组成部分, 佐剂的合理应用是鼻腔免疫策略成功的关键。研究者们已采用各种各样的疫苗载体或加入佐剂以提高疫苗在鼻腔处的吸收率, 如粉末制剂、微球制剂、溶液制剂或加入表面活性剂、黏膜渗透促进剂以及粘附剂等。其中凝胶制剂是较新的一类剂型。与常用的溶液剂型或粉末剂型相比, 它的黏度较高, 能有效延长疫苗在鼻腔中的停留时间, 同时实现疫苗的缓慢持续释放^[1]。

1 多糖类纳米载体——壳聚糖作为黏膜疫苗佐剂的优越性

壳聚糖是一种阳离子多聚糖, 来源于甲壳类动物外壳中的甲壳质, 是自然界中惟一含游离氨基碱性基的可食性动物纤维, 它具有良好的生物相容性和低毒性及促渗作用, 在药学和医学领域倍受关注: 它能与活体组织相容, 被体内的溶菌酶、胃蛋白酶降解后, 降解产物能完全被人体吸收, 无毒、无副作用而且壳聚糖还具有降低血脂、提高免疫力、抗肿瘤等特点, 目前已作为一种新型的保健品上市销售^[2]。对壳聚糖进行季铵化修饰

后并不会影响其生物相容性和可降解性。此外, 壳聚糖还具有良好凝结能力和免疫刺激活性。壳聚糖制剂可以是粉末、溶液、水凝胶或胶体颗粒(微粒和纳米粒)。壳聚糖纳米粒比溶液制剂更有效地促进黏膜对疫苗吸收, 增强机体对疫苗的免疫反应。研究者已证明含有可溶性壳聚糖流感疫苗与普通的水溶性流感疫苗相比, 该制剂能促进小鼠体内血凝抑制抗体的产生。基于上述生物特性, 壳聚糖在黏膜免疫中得到了广泛应用。它作为黏膜疫苗佐剂有如下优点:

1.1 黏膜吸附特性 壳聚糖是由葡萄糖胺和 N-乙酰基葡萄糖胺共聚物组成的一种天然多糖, 是甲壳素 N-脱乙酰基后的衍生物。其分子中的羟基、氨基可与黏膜粘液中带负电荷的糖蛋白形成氢键而产生粘附作用, 这样可以延缓抗原的清除, 使其有更多的时间与黏膜接触, 使抗原易穿过黏膜屏障与黏膜下的淋巴组织发生作用。壳聚糖黏膜吸附性微球能诱导黏膜和系统免疫反应。微球与小肠中下游黏膜之间的粘附性, 能够加强它与肠腔表面的紧密接触, 有利于微球继续向集合淋巴结(PP)转运, 进而引起全身及黏膜免疫反应。另外, 最新报道指出, 硫酸化壳聚糖由于具有更高的生物粘附性, 可用于促进基因转染和传递。它能浓缩 DNA, 已有研究用绿色荧光蛋白包裹的质粒模型证实了其体内外的基因表达。说明纳米复合物在后期可产生更强的基因表达, 这是由于基因的缓慢释放和表达所致^[3]。

1.2 促渗作用 壳聚糖可使黏膜上皮细胞紧密结

合蛋白的结构发生改变,从而开放跨膜通道,提高黏膜通透性,促进肽类等水溶性大分子的跨黏膜吸收。用壳聚糖及其衍生物作用 Caco-2 细胞单层,可引起跨上皮细胞电阻降低,表明壳聚糖能打开细胞旁紧密连接,因此它能促进大分子药物尤其是蛋白质类药物和抗原顺利通过细胞旁路进入体内,增强药物的渗透吸收,提高药物的生物利用度。

1.3 免疫活性 壳聚糖可有效促进局部(特别是黏膜局部)的免疫反应,增强抗原传递系统功能,具有免疫佐剂和免疫调节效应。它能够提高巨噬细胞、T 细胞、浆细胞、B 细胞、嗜酸性粒细胞及多形核细胞的活性和积聚能力,阻止病原微生物的侵入和定居,诱导细胞因子如 IFN- γ 、IL-4 等的产生,激发有效的 T 细胞免疫应答,中和细菌毒素,增强迟发型变态反应和细胞毒性 T 细胞反应^[4]。用不含蛋白质抗原的壳聚糖口服研究,发现壳聚糖可引起 IL-10 释放及黏膜 IL-4 的表达,并激活脾脏的 CD₃⁺ T 细胞,明显上调黏膜 Th2 免疫反应,巨噬细胞摄取壳聚糖后即可活化。壳聚糖的这种非特异免疫佐剂作用与其脱乙酰化程度和剂型有关,脱乙酰化程度高的可溶性壳聚糖剂活性较弱,而颗粒状壳聚糖更易诱导巨噬细胞的吞噬作用。

2 壳聚糖在黏膜免疫中的佐剂效应

疫苗经鼻黏膜免疫产生的免疫反应常不能达到理想的免疫效果,故需依赖一些有效的黏膜免疫佐剂和载体系统。壳聚糖具有生物粘附性,可以延缓抗原的清除,还可开放跨膜通道,这种强助渗作用使抗原易穿过黏膜屏障与黏膜下的淋巴组织发生作用。将破伤风类毒素抗原包裹在壳聚糖-TPP 载体中,经滴鼻免疫小鼠后可诱导产生较高水平的特异性抗体,增加血浆 IgG、黏膜 IgA 的产生及诱导细胞免疫,且免疫应答与没加佐剂的相比可持续更长时间,这说明该佐剂促进了包裹的抗原到达鼻淋巴(NALT)和引流淋巴结,并实现了其缓慢释放。将流感病毒与壳聚糖共同接种于 Balb/c 小鼠的鼻腔内,血清 IgG 抗体明显升高并且还产生了局限性 sIgA 反应,说明壳聚糖可作为佐剂诱导局部黏膜免疫。用壳聚糖包裹脑膜炎双球菌疫苗(MCP-CRM197)免疫 Balb/c 小鼠,血清和黏膜产生很高的抗 MCP 特异性抗体,两次鼻免疫后血清杀菌效价升高 12 倍,明显增强了免疫保护水平。这表明壳聚糖可以促进黏膜淋巴组织对抗原的吸收,从而诱导出强烈

的全身和黏膜免疫应答。有研究报道,用壳聚糖衍生物 TMC 包裹流感病毒亚单位疫苗,经鼻免疫小鼠,血清产生较强的血凝抑制和特异性 IgG 抗体反应,高于肌肉注射疫苗组;第二次免疫效果进一步提高,远高于单独用疫苗经鼻免疫产生的抗体水平。进一步检测鼻肺冲洗液,单独抗原组和肌注组 IgA 分泌低或无,TMC 包裹抗原纳米粒组显著提高了黏膜特异性 IgA 分泌,表明壳聚糖衍生物可明显提高其局部和血清抗体反应^[5]。这些都显示出壳聚糖在鼻黏膜免疫中具有良好的佐剂效应。

3 PEG 交联壳聚糖季铵盐智能水凝胶作为黏膜传递系统的研究

与传统的水凝胶不同,智能水凝胶是能够响应外部刺激,其结构和特性(主要是体积或相态)能发生变化的一类水凝胶。多种物理和化学刺激信号均可被用于引发智能水凝胶产生相应改变。物理刺激信号包括温度、电场、溶剂组成、光、压力、声和磁场等;化学或生化刺激信号包括 pH、离子强度、抗体和特定分子等,如当发生变化或刺激时,水凝胶的体积会发生变化,呈现体积相转变行为(溶胀相 \leftrightarrow 收缩相);一旦外界刺激消失时,凝胶系统有自动恢复到内能较低的稳定状态趋势。以下主要讨论温度和 pH 及抗原敏感 PEG 交联壳聚糖季铵盐智能水凝胶作为黏膜传递系统的优越性^[6]。

抗原尤其是大分子抗原的透过率依然很低。针对这些缺点,研究者将疫苗制备成以 PEG 交联壳聚糖季铵盐智能水凝胶作为鼻黏膜传递系统的鼻用原位凝胶制剂,以液体形式给药,滴入鼻腔后转变为具有适宜生物粘附性的凝胶粘附于鼻黏膜上,可以延长疫苗在鼻腔内的滞留时间,降低纤毛对疫苗的清除率,减少流失和对咽部的刺激,因而具有生物利用度高、提高免疫保护、降低副反应等优点。

以 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶为传递系统与布鲁氏菌 104M 活疫苗等体积混合,滴鼻免疫 Balb/c 小鼠后,诱导血清中 IgG、IgA 抗体比单活菌苗组显著升高,同时诱导鼻咽、肺特异性黏膜抗体 IgA 升高,尤其是肺灌洗液内抗体升高极为显著。该滴鼻免疫组的小鼠血清中细胞因子 IFN- γ 、IL-4 的分泌量显著高于单活菌组。流式仪检测显示以 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶加 104M 活菌苗

(下转第 14 页)

发酵抑制剂对紫花苜蓿青贮发酵品质的影响

陈卢亮¹, 李 静²

(1. 漳州市亚行贷款项目办公室, 福建 漳州 363000; 2. 中国农业大学草业科学系, 北京 100193)

摘要: 本试验以紫花苜蓿为研究材料, 探讨添加发酵抑制剂对其乳酸菌数量和青贮品质的影响。试验设置了对照、甲酸(0.5%、0.8%)、丙酸(0.5%、0.8%)和Silo guard(0.05%、0.1%)7个处理, 调制青贮饲料, 30 d后开封并取样分析。结果表明, 添加剂甲酸和丙酸(0.5%、0.8%)在一定程度上抑制了紫花苜蓿青贮饲料乳酸菌(LAB)的生长繁殖, 乳酸含量较低, 但pH值、氨态氮占总氮比例(NH₃-N/TN)、丁酸含量均显著低于对照组(P<0.05), 明显改善了紫花苜蓿青贮饲料的发酵品质。发酵抑制剂Silo guard(0.1%)也使pH值和丁酸含量显著下降(P<0.05)而对乳酸含量没有明显影响。

关键词: 紫花苜蓿; 青贮; 添加剂; 发酵品质

中图分类号: S815.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0011-04

Effect of different additives on the fermentation quality of alfalfa silage

Chen Luliang¹, Li Jing²

(1. ADB Loan Project Office of Zhangzhou, Zhangzhou 363000, China; 2. Department of Grassland Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: A laboratory-scale experiment was conducted to evaluate the ensiling effects and LAB counts in alfalfa added with different additives including formic acid (0.5%,0.8%), propionic acid(0.5%,0.8%) or Silo guard (0.05%,0.1%). At the end of the ensiling period (30days), the silages were sampled for analyses of fermentation quality, chemical composition and LAB counts. The study showed that the growth of LAB in Alfalfa silage was inhibited in some extent and the concentration of lactic acid decreased when formic acid or propionic acid was added at the rate of 0.5% and 0.8%. In addition, the pH value, ammonia nitrogen/total nitrogen (NH₃-N/TN) and butyric acid content decreased significantly(P<0.05). pH value and butyric acid content were also decreased in the group with 0.1% Silo guard(P<0.05) but the lactic acid content did not be influenced.

Key words: Alfalfa; silage; additives; fermentation quality

苜蓿(*Medicago sativa L.*)是世界上最重要的豆科牧草之一,有“牧草之王”的美称。其茎叶细软,叶量丰富,营养价值高,在我国的北方地区广为栽培。目前苜蓿的储备方式以调制干草为主,但因植株不同部位干燥的同步性差造成叶片等高营养价值部位脱落,且鲜草遭雨淋后可溶性营养物质会大量流失,易遭霉菌感染而腐败变质。而对苜蓿牧草进行青贮调制可以不受环境条件的限制,还可最大限度地减少叶片的损失。但因苜蓿缓冲能值高,可溶性碳水化合物含量较低且原料草中乳酸菌数量少,高水分条件下直接青贮很难获得优质青贮饲料^[1]。目前研究多为通过增加乳酸菌

数量或添加糖蜜促进乳酸菌发酵达到改善青贮发酵的目的^[2,3],而研究发酵抑制剂对苜蓿青贮发酵品质影响的报道较少。因而本试验通过添加发酵抑制剂,分析苜蓿青贮饲料的发酵品质和营养物质,检测青贮发酵前后乳酸菌数量及开袋放置不同时间后霉菌数量的变化,评价发酵抑制剂对紫花苜蓿青贮饲料的防腐效果,为科学利用苜蓿牧草提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和添加剂 试验材料:紫花苜蓿源于中国农科院畜牧兽医研究所试验地,第二茬开花初期刈割。添加剂:甲酸:分析纯;丙酸:分析纯;青贮

卫士: 主要成分为硫酸钠、亚硫酸钠、硫酸钾、糖化麦芽和丙二醇等。

1.2 试验设计 本试验共设置 6 个处理和一组对照, 每个处理三个重复(表 1)。

表 1 紫花苜蓿青贮实验设计方案

处理	CK	FA1	FA2	PA1	PA2	SG1	SG2
添加水平	0	0.5%	0.8%	0.5%	0.8%	0.05%	0.1%

注: CK: 对照, FA1~2: 甲酸, PA1~2: 丙酸, SG1~2: 青贮卫士

1.3 试验方法

1.3.1 青贮调制 将紫花苜蓿切短至 1~2 cm, 依照试验设计均匀混入添加剂, 装入聚乙烯袋(塑料袋为真空加工用的尼龙材质, 单层厚度 0.65 mm, 规格为 280 mm×300 mm), 每袋装入原料约 200 g, 抽真空封口。室温条件下放置 30 d 后开启, 取样分析各项指标。

1.3.2 测定项目与方法 鲜样取回实验室立即采用 MRS 培养基平板计数法测定乳酸菌数量和缓冲能值^[4]。青贮调制时取原料样品, 在 65℃ 条件下烘干 48 h 测定干物质(DM); 烘干样过 40 目筛后用 FOSS 公司全自动定氮仪测定粗蛋白(CP); 范式洗涤纤维方法测定中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)和酸性洗涤木质素(ADL)^[5], 采用蒽酮-硫酸法测定可溶性碳水化合物(WSC)^[6]。

称取青贮料 20 g, 加入 180 mL 蒸馏水, 搅拌均匀后用组织捣碎机搅拌 1 min, 四层纱布和定性滤纸过滤, 用 pH 测定仪测定滤液的 pH 值; 0.45 μm 的滤膜过滤后, 用 SHIMADZE-10A 型高效液相色谱仪测定乳酸(LA)、乙酸(AA)、丙酸(PA)、丁酸(BA)含量; 苯酚-次氯酸钠比色法测定氨态氮(NH₃-N)含量^[7]; 烘干粉碎后同原料一样测定 DM、CP、NDF、ADF、ADL、WSC。

1.3.3 数据统计 试验所得数据用 Excel 软件处理, 并用 SAS 8.02 软件中的 GLM 程序对数据进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿原料草上附着的乳酸菌数量、营养成分及缓冲能值 见表 2。

2.2 添加剂对紫花苜蓿 pH 值和乳酸菌数量的影响 紫花苜蓿青贮饲料的 pH 值和乳酸菌数量如图 1 所示。除了处理 SG1 与对照的 pH 值没有显著差异, 其他处理均显著降低了紫花苜蓿青贮饲

料的 pH 值($P < 0.05$), 其中, 处理 PA2 使青贮料的 pH 值降至最低点 3.59。各处理组的乳酸菌数量也均明显低于对照组($P < 0.05$)。

表 2 紫花苜蓿原料的乳酸菌数量、营养成分及缓冲能值

项目	结果
干物质(%)	24.92
可溶性碳水化合物(%DM)	8.29
粗蛋白(%DM)	22.76
中性洗涤纤维(%DM)	38.01
酸性洗涤纤维(%DM)	23.83
酸性洗涤木质(%DM)	6.70
乳酸菌数量 log CFU/g	3.79
缓冲能值(mE/kg·DM)	553.17

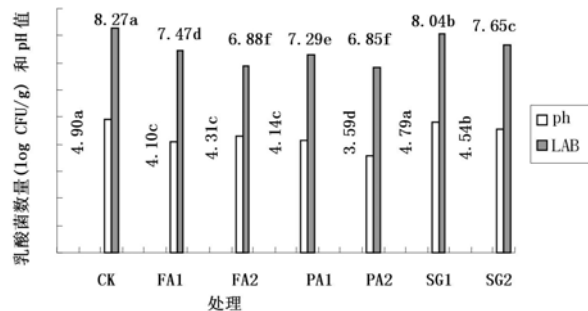


图 1 添加剂对紫花苜蓿 pH 值和乳酸菌数量的影响

2.3 添加剂对紫花苜蓿青贮发酵品质的影响 青贮饲料中氨态氮占总氮的比例和有机酸的含量及其组成成分是衡量饲料发酵品质的重要指标。由表 3 可知, 各添加剂处理均能显著提高紫花苜蓿青贮料的干物质含量($P < 0.05$)。FA1、FA2、PA1 和 PA2 的氨态氮/总氮比值和乳酸含量均明显低于对照组($P < 0.05$), 而 SG1 和 SG2 的氨态氮/总氮值、乳酸含量、各处理组的乙酸含量均与对照没有明显差异($P > 0.05$)。处理 PA1、PA2 和 SG1 显著提高了紫花苜蓿青贮饲料的丙酸含量($P < 0.05$)。除了 SG1 组外, 各处理组均能明显降低青贮饲料的丁酸含量($P < 0.05$)。

2.4 添加剂对紫花苜蓿营养成分的影响 如表 4 所示, 除了 SG1 组外, 各处理组的粗蛋白含量均高于对照组, 但差异不显著($P > 0.05$)。各处理组对紫花苜蓿青贮饲料的 NDF、ADF 和 ADL 均无明显影响($P > 0.05$)。而 FA1、FA2、PA1 和 PA2 的 WSC 含量显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

牧草作物在发酵前、发酵过程中及发酵完成

表 3 添加剂对紫花苜蓿青贮发酵品质的影响

单位: 占干物质% (%DM)

处理	干物质	氨态氮/总氮(NH ₃ -N/TN)	有机酸			
			乳酸	乙酸	丙酸	丁酸
CK	23.53d	5.51a	7.42a	3.73	0.38c	0.30a
FA1	27.89ab	0.48b	0.00b	2.22	0.02c	0.08bc
FA2	28.31a	0.28b	0.00b	3.87	0.02c	0.03bc
PA1	27.73ab	0.62b	0.41b	2.74	2.15b	0.07bc
PA2	27.33abc	0.66b	0.25b	2.16	3.77a	0.02c
SG1	26.36bc	5.16a	7.60a	2.14	2.76b	0.17ab
SG2	25.65c	4.44a	9.21a	2.79	0.12c	0.09bc
SEM	0.39	0.43	1.12	0.31	0.34	0.02

1): 不同小写字母表示平均数差异显著(P<0.05)。下表同。

表 4 添加剂对紫花苜蓿营养成分的影响

单位: 占干物质% (%DM)

处理	粗蛋白(CP)	中性洗涤纤维(NDF)	酸性洗涤纤维(ADF)	酸性洗涤木质素(ADL)	可溶性碳水化合物(WSC)
CK	18.27ab ¹⁾	37.47	23.45	5.91	2.31b
FA1	19.86a	37.52	24.04	6.53	7.28a
FA2	19.50a	37.48	23.65	5.91	6.81a
PA1	19.37a	38.05	23.50	6.23	6.63a
PA2	19.13a	37.20	23.41	6.22	7.09a
SG1	18.23ab	37.15	23.46	6.07	1.77b
SG2	18.78ab	37.13	23.48	6.56	2.27b
SEM	0.20	0.19	0.21	0.15	0.21

后,其上附着的微生物种类和数量都不相同。鲜牧草上附着的微生物总量约 10⁵~10⁹,因牧草种类不同而有所差异^[8],所含微生物主要是需氧真菌和细菌,如大肠菌群、酵母菌、霉菌,它们对青贮发酵过程无任何促进作用。随着青贮窖内缺氧程度的加深,它们的生长逐渐受到抑制,而作物上附着的乳酸菌(LAB)是青贮发酵的重要菌群。通常情况下天然附着的 LAB 数量<5log CFU/g^[9,10],而作物在青贮发酵过程中 LAB 能快速增殖。本试验中所用的紫花苜蓿原材料乳酸菌数量为 3.79log CFU/g,青贮发酵 30 d 后未作处理的青贮料含乳酸菌数量增加到 8.27log CFU/g。而添加甲酸、丙酸和 Silo guard 后青贮料的乳酸菌含量均少于对照组。说明添加发酵抑制剂在一定程度上影响了乳酸菌的生长繁殖,但各处理组的 pH 值均低于对照组,原因可能是甲酸和丙酸本身具有快速降低 pH 值的作用。

甲酸和丙酸是生产中常用的青贮发酵抑制

剂,可抑制酵母菌、细菌等微生物的生长,0.5%~0.8%的添加量可作为不易青贮作物的保存剂。大量研究证明苜蓿青贮时添加甲酸和丙酸,其干物质和蛋白质消化率明显提高,窖贮苜蓿在开窖后其好氧性发酵开始的时间也会推迟。本试验分别使用 0.5%和 0.8%的浓度对紫花苜蓿进行处理,均明显提高了青贮料的干物质含量,降低了氨态氮和丁酸的产生量,并有效保存了饲料中可溶性碳水化合物的含量。从各发酵指标来看,0.8%的处理效果稍优于 0.5%,但差异不显著。

发酵抑制剂“青贮卫士”的主要成分硫酸盐,具有“吸氧剂”的作用,可促进青贮饲料快速进入无氧发酵阶段,对梭菌和肠杆菌有抑制效应。本试验添加后青贮料的乳酸菌数量均低于对照组,但乳酸含量与对照组差异不显著。0.05%的添加量对紫花苜蓿青贮饲料的 pH 值、乳酸、丁酸、氨态氮含量均无明显影响,而 0.1%添加量的 pH 值和氨态氮含量显著低于对照组,说明低浓度的“青贮卫士”对紫花苜蓿青贮发酵没有明显影响,0.1%的处理可以在一定程度上提高其发酵品质。

4 结论

4.1 甲酸、丙酸和“青贮卫士”都会在一定程度上影响紫花苜蓿青贮饲料中乳酸菌的生长。

4.2 0.5%或 0.8%的甲酸和丙酸均能有效改善紫花苜蓿的青贮发酵品质,且两种添加浓度效果无明显差异。

4.3 添加 0.05%的“青贮卫士”不能改善紫花苜蓿的青贮发酵品质,而 0.1%可以明显降低其 pH 值和氨态氮/总氮含量。

参考文献:

- [1] Yimin Cai, Sadahiro Ohmomo, Sumio Kuma. Distribution and Lactate Fermentation Characteristics of Lactic Acid Bacteria on Forage Crops and Grasses[J]. Grassland Science, 1994, 39(4): 420-428.
- [2] Cao L M, Masakazu G, Mitsuaki O. Variations in the fermentation characteristics of alfalfa silage of different harvest times as treated with fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria[J]. Grassland Science, 2002, 47(6): 583-587.
- [3] Cao L M, Goto M, S Karita, et al. Effect of fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria on the fermentation quality of alfalfa (Medicago sativa L.) silage and its energy and nitrogen utilization by

- dry cows[J]. Grassland Science, 2002, 48(3):227-235.
- [4] Playne M J, McDonald P. The buffering constituents of herbage and silage[J]. J Sci Food Agric, 1966, 17: 264-268
- [5] 王加启, 于建国. 饲料分析与检验[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004, 46-51.
- [6] 宁开桂. 实用饲料分析手册[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1993, 36-37.
- [7] Broderica G A, Kang J H. Automated simultaneous determination of ammonia and amino acids in ruminal fluid and in vitro media [H]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(1):64-75.
- [8] Longston C w, Bouma C. A study of the microorganism of grass silage II. The lactobacilli [J]. Appl Microbiol, 1960, 8:223-234.
- [9] Lin C. Epiphytic micro flora on alfalfa and corn; Lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods; and the effect of additives on microbial succession and silage fermentation[M]. Ph D diss. Kansas State University, Manhattan, KS:1992.
- [10] Cai Y S, Kumai. The proportion of lactate isomers in farm silage and the influence of inoculation with lactic acid bacteria on the proportion of L-lactate in silage[J]. Anita Sci Technol (Jpn), 1994, 65:14-21.

(上接第 10 页)

组的小鼠 CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 细胞数量显著升高, 这显示 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶作为黏膜传递系统能使疫苗增强脾脏的细胞免疫水平。

以上说明以 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶作为传递系统制备的疫苗不仅能提高疫苗的全身免疫应答, 还能促进诱导呼吸道等局部黏膜 sIgA 抗体, 增强局部免疫应答, 提高细胞免疫水平, 为高效黏膜疫苗的免疫保护奠定了基础。

5 结束语

壳聚糖纳米载体和 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶作为疫苗载体的研究尚处于起步阶段。它们作为一种新兴的非病毒基因载体材料, 具有与机体生物相容性好、可生物降解等优点, 体内外实验已初步显示出良好的应用前景。近年来, 国外对鼠疫黏膜疫苗的研究日益受到重视, 并取得了突破性的研究结果, 研制采用壳聚糖纳米载体为佐剂的鼠疫 F1-V 重组蛋白黏膜疫苗以进入 I 期临床。随着研究的深入和新剂型的开发, 壳聚糖纳米载体和 PEG 交联壳聚糖季铵盐水凝胶作为佐剂和载体在黏膜免疫中将发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 卓仁禧, 张先正. 温度及 pH 敏感聚(丙烯酸)/聚(N-异丙基丙烯酰胺)互穿聚合物网络水凝胶的合成及性能研究[J]. 高分子学报, 1998, (1):39-42.
- [2] 程东, 韩晓英, 冯宁, 等. 壳聚糖的毒性研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(2):162-164.
- [3] 王怡婷, 沃恩康. 载基因壳聚糖纳米粒的免疫增强效应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(45):8835-8838.
- [4] Wang J, Tabata Y, Morimoto K. Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs: Evaluation of in vitro release and in vivo insulin absorption in rats[J]. J Control Release, 2006, 113:31-37.
- [5] 魏雕, 陆丽芳, 钟高仁, 等. 温度敏感型原凝胶用于蛋白类药物缓释注射给药系统的初步研究[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(9):597-601.
- [6] 张永振, 徐建国. 黏膜免疫系统与黏膜免疫应答的诱导[J]. 细胞生物学杂志, 2001, 23(1):9-16.
- [7] 岳斌, 吴承训. 聚丙烯酰胺水凝胶的 pH 敏感性研究[J]. 合成技术及应用, 2006, 21(1):8-11.
- [8] 杨倩, 周广礼. 动物黏膜免疫新进展[J]. 畜牧与兽医, 2001, 33(5):38-39.
- [9] Martin F, Kagnoff. Mucosal immunology: New frontiers [J]. Immunol Today, 1996, 17(2):57-59.
- [10] Hacker G, Redecke V, Hacker H. Activation of the immune system by bacterial CpG DNA [J]. Immunol, 2002, 105(3):245-251.
- [11] Mitra R, Pezron I, Chu W A, Mitra A K. Lipid emulsions as vehicles for enhanced nasal delivery of insulin [J]. Int J Pharm, 2000, 205(1-2):127-134.
- [12] Callens C, Pringels E, Remon J P. Influence of multiple nasal administrations of bioadhesive powders on the insulin bioavailability [J]. Int J Pharm, 2003, 250(2):415-422.
- [13] 张艳艳, 马启敏, 江志华. 壳聚糖季铵盐的合成及性质研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(3):459-462.
- [14] Krieg A M, Yi A K, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation [J]. Nature, 1995, 374(6522):546-549.
- [15] Merkus F W H M, Verhoef J C, Marttin E, et al. Cyclo-dextrins in nasal drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 36:41-57.
- [16] Urrusuno R F, Calvo P, Lopez C R, et al. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles [J]. Pharm Res, 1999, 16:1576-1581.

绵羊精液稀释液中添加 PUFA 对冷冻精液品质的影响

杨 健¹, 王丽芳¹, 孙彩霞¹, 荣威恒^{2*}, 刘德全³, 张文斌⁴

(1. 呼和浩特市农牧业局, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 010020; 3. 呼和浩特市清水河县畜牧局, 内蒙古 呼和浩特 016000; 4. 呼和浩特市和林格尔县农牧业局, 内蒙古 呼和浩特 011500)

摘要: 通过在绵羊精液冷冻稀释液葡 3-3 稀释液 (葡萄糖-柠檬酸盐-卵黄) 中添加富含多不饱和脂肪酸 (PUFA) 的深海鱼油, 研究其对绵羊精子冷冻-解冻过程的作用。

关键词: 绵羊; 精液稀释液; 多不饱和脂肪酸; 影响

中图分类号: S814.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0015-03

Effect of PUFA supplementation in the sheep semen diluent on frozen semen quality

Yang Jian¹, Wang Lifang^{1,2}, Sun Caixia¹, Rong Weiheng², Liu Dequan³, Zhang Wenbin⁴

(1. Huhhot Agriculture and Stockbreeding Office, Huhhot, 010020, China; 2. Inner Mongolia Academy of Animal Science, Huhhot 010030, China; 3. Qing Shuihe Agriculture and Stockbreeding Office of Huhhot, Huhhot 016000, China; 4. He Lingeer Agriculture and Stockbreeding Office of Huhhot, Huhhot 011500, China)

Abstract: The effect of fish oil enriched PUFA on the sheep frozen-thawed semen was studied through supplementation of fish oil in the glucose 3-3(glucose-citrate-yolk), a sheep semen diluent.

Key words: Sheep; semendiluent; PUFA; effect

我国从 1974 年开始进行绵羊冷冻精液的保存研究,但其发展较慢。冷冻精液解冻后精子复苏率低、畸形精子多而致受胎率明显低于鲜精。主要原因是现有绵羊精液冷冻稀释液还未有效提高精子的抗冻害能力。本实验以葡 3-3 稀释液(葡萄糖-柠檬酸盐-卵黄)为基础,以富含多不饱和脂肪酸(PUFA)的深海鱼油作为冷冻绵羊精液的新型添加剂,通过检测一系列指标,研究 PUFA 对绵羊精子冷冻-解冻的保护作用,以期找出更适于绵羊精液冷冻的新途径^[1,2]。

1 材料与方 法

1.1 试验动物 试验用精液采自内蒙古乌兰察布市家畜改良站引进的 9 只体重相近的成年无角道塞特公羊。

1.2 主要试剂 天然金枪鱼油: 澳大利亚 Australly-Health Pty.Ltd (其中含 DHA 29.6%、

EPA 49.4%)、进口食品标签审批号: J85200014353。

基础稀释液: 中国农科院畜牧所研制葡 3-3 稀释液。精清理化指标检测试剂: 钙测定试剂盒、血清钠测定试剂盒、谷草转氨酶(GOT)测定试剂盒、氯化物测定试剂盒和乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所生产。

1.3 试验仪器 恒温电热板(金坛市杰瑞尔电器有限公司制造)、全自动恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司制造)、星星可调式冷柜(星星电器有限公司制造)、Nikon YS-100 型显微镜、简易急速冻结器 94 LNG-300 型(东京富士平工业株式会社制造)、FHK 精液低温处理装置(东京富士平工业株式会社制造)、美国 DU-640 紫外分光光度计。

1.4 试验方法 参照杨健(2006)的绵羊精液冷冻、解冻及测定方法^[3]。

1.5 试验设计 本试验对不添加 VE 作抗氧化保

护剂的情况下, 仅添加不同比例多不饱和脂肪 (PUFA) 和分两步稀释法添加不同比例多不饱和脂肪 (PUFA), 研究在绵羊精液稀释液中添加 PUFA 对冷冻精液主要品质的影响。

1.6 统计分析 用 Microsoft 公司的 Excel 2000 软件和 SAS 6.12 软件包中的 ANOVA 对试验数据进行方差分析和 DUNCAN 法多重比较。

2 结果与分析

2.1 一步法添加不同比例多不饱和脂肪对冷冻效果的影响 绵羊精液冷冻稀释液中仅添加不同浓度的富含多不饱和脂肪酸 (PUFA) 的深海鱼油 (不添加 VE 作抗氧化保护), 采用两步稀释法, 将鲜精活率在 0.60 以上的混合后冷冻, 解冻后活率和顶体完整率及理化指标变化统计分析见表 1 和表 2。

表 1 稀释液中仅添加 PUFA 解冻后活率和顶体完整率变化

处理	PUFA 添加浓度 (V/V)	解冻后活率	解冻后顶体完整率
I (对照组)	0%	0.296 ± 0.011 ^{E D}	0.312 ± 0.002 ^C
II	0.5%	0.302 ± 0.003 ^D	0.358 ± 0.001 ^B
III	1%	0.313 ± 0.005 ^C	0.365 ± 0.010 ^B
IV	2%	0.321 ± 0.012 ^B	0.383 ± 0.003 ^{A B}
V	3%	0.345 ± 0.004 ^A	0.396 ± 0.015 ^{A B}
VI	5%	0.343 ± 0.002 ^A	0.398 ± 0.002 ^A

1): 同列肩注字母相同, 差异不显著 ($P > 0.05$); 同列肩注字母不同, 差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

表 2 稀释液中仅添加 PUFA 解冻后理化指标变化

PUFA 添加浓度 (V/V)	Ca ²⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	LDH 酶活力 (U/L)	GOT (卡门氏单位)	
鲜精	0.601 ^F	8.821 ^G	15.957 ^G	234.857 ^G	0.0213 ^E	
处理						
I (对照组)	0%	0.87 ^E	30.907 ^F	229.618 ^E	5379.987 ^D	0.0415 ^C
II	0.5%	0.902 ^D	93.622 ^B	368.542 ^D	11346.322 ^B	0.0449 ^B
III	1%	1.408 ^B	102.635 ^A	383.394 ^B	1050.762 ^E	0.0455 ^A
IV	2%	1.542 ^A	42.312 ^E	208.581 ^F	747.515 ^F	0.0397 ^D
V	3%	1.211 ^C	65.764 ^D	550.527 ^A	5878.33 ^C	0.0411 ^C
VI	5%	0.456 ^G	86.211 ^C	375.953 ^C	15513.32 ^A	0.0441 ^B

由表 1、2 可知, 绵羊精液冷冻稀释液中仅添加 0.5~5% 多不饱和脂肪酸, 在没有 VE 作保护时, 处理组 II、III、IV、V、VI 解冻后活率和顶体完整率显著高于对照组 ($P < 0.05$)。其中处理组 V、VI 解冻后

活率显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); 处理组 IV、V、VI 解冻后顶体完整率显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); 除 5% PUFA 添加浓度以外, 解冻后精清中钙离子浓度显著低于鲜精 ($P < 0.05$), 其余处理组冷冻精液解冻后精清中钙离子浓度、钠离子浓度、氯离子浓度及 LDH 酶 (乳酸脱氢酶) 活力、GOT 酶 (谷-草转氨酶) 活力显著高于鲜精 ($P < 0.05$)。

2.2 分两步添加不同比例多不饱和脂肪 (PUFA) 对冷冻效果的影响 由前一部分实验可知, 绵羊精液稀释液中添加 2%~5% 多不饱和脂肪酸时, 可显著提高精液解冻后活率和顶体完整率 ($P < 0.05$)。采用正交设计, 在绵羊精液稀释液中分两步添加 2%~5% 多不饱和脂肪酸, 对冷冻精液主要品质的影响统计分析结果见表 3 和表 4。

表 3 两步法添加不同 PUFA 对绵羊冷冻精液活率和顶体完整率的影响

处理	第一步稀释 (V/V) (PUFA 添加浓度)	第二步稀释 (V/V) (PUFA 添加浓度)	解冻后活率	解冻后顶体完整率
(1)	2%	2%	0.321 ± 0.022 ^C	0.383 ± 0.012 ^C
(2)	2%	3%	0.342 ± 0.016 ^B	0.391 ± 0.020 ^C
(3)	2%	5%	0.353 ± 0.009 ^{AB}	0.460 ± 0.022 ^A
(4)	3%	2%	0.318 ± 0.023 ^C	0.423 ± 0.018 ^B
(5)	3%	3%	0.345 ± 0.018 ^B	0.396 ± 0.015 ^C
(6)	3%	5%	0.309 ± 0.015 ^C	0.351 ± 0.011 ^D
(7)	5%	2%	0.356 ± 0.021 ^{AB}	0.392 ± 0.006 ^C
(8)	5%	3%	0.365 ± 0.001 ^A	0.396 ± 0.015 ^C
(9)	5%	5%	0.343 ± 0.012 ^B	0.398 ± 0.005 ^C

表 4 两步法添加不同 PUFA 对绵羊冷冻精液解冻后理化指标变化

处理	Ca ²⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	Na ⁺ (mmol/L)	LDH 酶活力 (U/L)	GOT (卡门氏单位)
鲜精	0.601 ^H	8.821 ^J	15.957 ^H	234.857 ^J	0.0213 ^J
处理					
(1)	0.623 ^G	84.764 ^A	384.918 ^F	9856.594 ^A	0.0397 ^I
(2)	0.992 ^B	63.313 ^C	574.852 ^B	554.539 ^H	0.3462 ^D
(3)	0.674 ^F	56.957 ^E	593.379 ^A	5962.094 ^E	1.795 ^A
(4)	0.588 ^I	47.405 ^F	387.966 ^F	1223.592 ^C	0.5509 ^C
(5)	0.792 ^D	60.884 ^D	564.154 ^D	9246.918 ^C	0.0411 ^H
(6)	0.92 ^C	23.71 ^I	570.1 ^C	9379.457 ^B	0.8159 ^B
(7)	0.463 ^J	37.698 ^H	404.192 ^E	3910.404 ^F	0.2382 ^E
(8)	0.767 ^E	70.687 ^B	569.383 ^C	479.258 ^I	0.1555 ^F
(9)	1.075 ^A	42.777 ^G	365.617 ^G	6764.745 ^D	0.0441 ^G

由表 3 可以看出: 绵羊精液第一步稀释液中添加 5% 多不饱和脂肪酸, 第二步添加 3% 组显著提高解冻后活率 ($P < 0.05$), 且最高为 36.5%; 绵羊精液第一步稀释液中添加 2% 多不饱和脂肪酸系列, 第二步添加 5% 组显著提高解冻后顶体完整率 ($P < 0.05$), 且最高为 46%。

由表 4 可以看出, 各处理组冷冻精液解冻后精清中钙离子浓度、钠离子浓度、氯离子浓度及 LDH 酶(乳酸脱氢酶)活力、GOT 酶(谷-草转氨酶)活力显著高于鲜精 ($P < 0.05$); 各处理组解冻后精清中氯离子浓度显著高于鲜精组 ($P < 0.05$); 处理组(1)解冻后精清中 LDH 酶(乳酸脱氢酶)活力显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); 处理组(3)解冻后精清中 GOT 酶(谷-草转氨酶)活力显著高于其他处理组和对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

有研究表明, 精清中 LDH 酶(乳酸脱氢酶)活

力和 GOT 酶(谷-草转氨酶)活力与绵羊受胎率呈显著负相关。离子的跨膜运动对精子获能及 AR 有重要作用, 冷刺激前后精子和精清中离子浓度变化的原因是精细胞膜的渗透性发生了变化。深海鱼油 PUFA 中主要成分为 DHA 和 EPA, 其具有强的膜通过性, 渗透入精子细胞对头部保护, 防止了酶的渗出和钙离子的流入。但由于 PUFA 有多个不饱和双键易被氧化, 而在稀释液中缺乏抗氧化物, 减弱了 PUFA 对精子保护作用, 出现结果不规律现象。

参考文献:

- [1] 罗海玲. 脂溶性维生素对绵羊主要繁殖性能的影响[D]. 中国农业大学博士后学位论文, 2003.
- [2] 杨凌, 桑润滋, 张会文. 羊精液冷冻保存技术研究进展[J]. 中国草食动物, 2004, 24(1): 49-51.
- [3] 杨健. 绵羊精液稀释液添加 PUFA 对精子冷冻保护效果研究[D]. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2006.

我国将对多种动物疫病进行强制免疫

记者从农业部兽医局了解到, 为防止重大动物疫病发生和流行, 农业部将对高致病性禽流感等多种动物疫病进行强制免疫, 并根据相关的法律法规, 制定了《2011 年国家动物疫病强制免疫计划》。

该《计划》对 2011 年高致病性禽流感、高致病性猪蓝耳病、口蹄疫、猪瘟等四种动物疫病强制免疫总体要求是, 其群体免疫密度常年维持在 90% 以上, 其中应免畜禽免疫密度要达到 100%, 免疫抗体合格率全年保持在 70% 以上。

《计划》要求各级地方人民政府对辖区内动物防疫工作负总责, 组织有关部门按照职责分工, 落实国家动物疫病强制免疫计划, 保证免疫密度。各级兽医部门具体实施免疫计划, 负责强制免疫动物疫病疫苗的采购、保存、使用监管, 制定并执行强制免疫计划实施方案。

各级财政部门负责落实动物疫病强制免疫计划执行所需经费, 其他有关部门依法配合做好国家动物疫病强制免疫计划的实施工作。国家兽医参考实验室和相关动物疫病专业实验室负责疫病的科学研究, 追踪病毒变异情况, 按规定开展流行病学调查, 评价免疫效果, 保证诊断试剂供应。饲养动物的单位和个人应当依法履行动物疫病强制免疫义务, 按照兽医主管部门的要求做好强制免疫工作。定点疫苗生产企业负责保证疫苗质量, 承担疫苗质量责任, 做好售后服务。

同时, 各地要按照国家动物疫病强制免疫计划要求, 结合本地实际, 及时制定本省(自治区、直辖市)强制免疫计划实施方案, 加强免疫技术培训, 建立健全免疫档案和免疫信息报告。

该《计划》重点对疫苗监管进行了部署, 农业部将根据疫苗生产情况进行监督抽检, 对不合格疫苗产品信息进行通报。中国兽医药品监察所具体实施疫苗质量监管工作, 对疫苗质量进行监督检验, 对生产企业实行飞行检查, 必要时实行驻厂监督。省级兽医主管部门负责辖区内疫苗生产企业监督管理, 对投标企业诚信记录进行审核, 对疫苗的保存、运输、使用等环节冷链体系运行情况进行监管; 疫苗招标采购应以疫苗质量、售后服务和价格等综合指标为评判标准, 不得单纯采用询价方式采购。各定点疫苗生产企业不得采取恶意方式竞标, 不得以低于成本的价格参与竞标; 各疫苗生产企业不得超出使用范围宣传, 干扰国家动物疫病强制免疫计划; 严禁任何单位和个人倒买倒卖国家动物疫病强制免疫疫苗。(信息来源: 农民日报)

超数排卵对家兔早期胚胎体外发育的影响

曹君君

(汕头大学医学院实验动物中心, 广东 汕头 515041)

摘要: 为探讨超数排卵对家兔早期胚胎体外发育能力的影响, 收集自然发情组和超数排卵处理组交配 72 h 后家兔胚胎, 对经筛选合格的胚胎以小鼠成纤维细胞为饲养层进行体外培养, 以自然发情交配的家兔胚胎为对照, 观察培养 96 h 贴壁情况和内细胞团传代能力。超数排卵处理的家兔交配后经筛选所获得的可用胚胎数量增多; 其 96 h 贴壁率和成功传代内细胞团比率与自然发情组无显著差异。家兔超数排卵所获得的可用胚胎对其体外发育能力无显著影响。

关键词: 家兔; 胚胎; 体外培养; 传代

中图分类号: S814.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0018-03

Influence of superovulation on growth of early rabbit embryos in vitro

Cao Jun-Jun

(Shan Tou University Medicine College Laboratory Animal Center Guang Dong, Shan Tou 515041)

Abstract: To explore the effect of superovulation on developmental potential of early rabbit embryos, 72 hour-aged rabbit embryos were collected from natural intercourse rabbits and superovulation-treated rabbit, respectively. The embryos were selected according quality condition and subsequently cultivated on mouse fibroblast cell layers in vitro. The attachment of embryos in 96h culture was observed and the viability of Inner Cell Mass(ICM) was evaluated in passage culture. The results indicated that superovulation did not significantly affect attachment rate of embryos after 96h in vitro cultivation as well as subsequent passage culture of Inner Cell Mass from these embryos, although superovulation increased amount of the selected embryos in superovulation group. This study showed that superovulation had little impact on developmental potential of the selected rabbit embryo in vitro.

Key words: Rabbit; Embryos; Cultivation in vitro; Passage culture

超数排卵技术可增加单次排卵数量, 极大地提高动物生产效率, 在畜牧生产中运用广泛。随着卵子冷冻技术的成熟, 超数排卵对良种稀有动物繁育和保种显得至关重要。同时, 超数排卵所获得的大量卵子也为体外受精和胚胎干细胞的研究提供了丰富的材料。但是, 超数排卵过程所用激素在模拟动物生殖生理状态时, 也可能干扰了正常的卵子和胚胎发育进程, 对体外人工授精和胚胎发育产生意想不到的影响。本实验以自然交配获得的家兔早期胚胎为对照, 观察超数排卵处理家兔早期胚胎体外生长过程, 考察超数排卵对兔早期

胚胎体外发育的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明系小鼠 6-8 周龄; 日本大耳白兔, 3-6 月龄, 均购自河南医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 PMSG(宁波市激素制品厂, 批号: 040604); hCG(杭州市动物药品厂, 批号: 030210), 丝裂霉素 C(SIGMA, 0403), 0.25%胰酶-0.04%EDTA 混合液(GIBCO, No. 25200-072), DMEM(高糖/低糖, 无丙酮酸钠, GIBCO, No. 10566-016), 标准胎牛血清(Hyclone, No. CH30160.03), β-巯基乙醇(AMRESCO, 批号: 31185), 人重组白血病抑制因子

(hLIF, CYTOLAB, No. 300-05)。

2 方法

2.1 小鼠成纤维细胞饲养层制备 取怀孕 10.5~14.5 d 昆明小鼠断颈处死, 无菌打开腹腔取胎儿, 所得胎儿 PBS 冲洗 3 次, 去头、颈、四肢、尾巴和内脏, 眼科剪充分剪碎 ($<1 \text{ mm}^3$), 胰酶消化 25 min, 100 μm 的滤纱过滤, 滤液 1000 rpm 离心 5 min。弃去上清液, 用成纤维细胞培养液把沉淀的细胞重新悬浮, 通过细胞计数调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL, 接种于 50 cm^2 的培养瓶中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。1 h 后换液, 除去未贴壁的杂细胞和死细胞, 以后每两天换液一次。用前弃培养液, PBS 清洗 3 次, 加入适量的 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素 C 溶液, 放 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 3 h 后弃丝裂霉素 C 溶液, PBS 冲洗 5 遍, 加入 3 mL 消化液消化 3~5 min, 10 mL 离心管 1 000 rpm 离心 5 min, 弃去上清液, 细胞重新悬浮并调整至细胞浓度为 $5 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个/mL。吸去明胶预先铺陈的四孔板内多余的明胶, 用少量培养液清洗一遍, 然后加入制备好的细胞混悬液, 每孔 800 μL , 放 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 2 h, 观察细胞贴壁情况并每天半量换液。如果死亡细胞较多, 或者贴壁细胞数量很少, 则要补种细胞或重新制备饲养层。

2.2 胚胎的获取

2.2.1 自然发情的 6 月龄雌兔交配后 72 h 打开腹腔, PBS (90%无钙镁 PBS + 10%胎牛血清) 逐段冲洗子宫并收集冲胚液。从冲胚液中用吸管吸出胚胎, 放入基础培养液 (DMEM (低糖) + 10%胎牛血清 + 0.1 mmol/L β - 巯基乙醇 + 2 mmol/L 谷氨酰胺 + 100 IU/mL 青霉素 + 100 IU/mL 链霉素 + 丝裂霉素 C) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱温育待用。重复 4 次,

每次用一只雌兔。

2.2.2 选未发情 6 月龄雌兔, 8:30 取 PMSG 以 50 IU/kg 用量颈部皮下注射, 72 h 后检查发情情况, 发情良好者放入自然发情组交配用的公兔笼中交配, 交配成功后立即耳缘静脉注射 90 IU/kg HCG, 72 h 后按 2.2.1 方法手术获取胚。重复 4 次, 每次用一只雌兔。

2.3 胚胎分选及体外培养 将处于桑椹胚或囊胚阶段、形态正常、透明带完整、内细胞团细胞均匀的胚胎选出作为可用胚胎, 用胰酶消化掉外层粘蛋白并用玻璃针切开部分透明带, 然后置于含小鼠成纤维细胞饲养层的四孔板中, 每孔 1~2 枚胚胎, 每孔含条件培养液 (DMEM (低糖) + 10%胎牛血清 + 0.1 mmol/L β - 巯基乙醇 + 2 mmol/L 谷氨酰胺 + 100 IU/mL 青霉素 + 100 IU/mL 链霉素 + 丝裂霉素 C + 1000 IU/mL LIF) 800 μL , 然后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。胚胎贴壁前每两天半量换液一次, 贴壁后每天换液。每天定时观察囊胚的生长状态和培养 96 h 内细胞团贴壁行为。

2.4 胚胎细胞传代培养 培养 96 h 后挑取贴壁并扩增的胚胎于 200 μL 0.125%胰酶 + 0.02% EDTA 消化液中消化 60 秒并加等量培养液中和, 再用细玻璃针机械分散内细胞团团块, 使成为多个细胞连在一起的小团块, 然后把这些小团块接种至饲养层为小鼠胎儿成纤维细胞的 LIF 条件培养基中, 四孔板内每一个孔接种一个内细胞团, 观察其生长行为, 并对新长成的细胞团以同样方法传代。

3 统计分析

实验结果采用 t 检验和单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。

表 1 超数排卵对家兔胚胎贴壁和 ICM 传代的影响¹⁾

组别	重复次数	可用胚胎数 (枚)	培养 96 h 贴壁数 (%)	可用于传代的 ICM 数 (%)	传不同代数的胚胎数量 (枚) (%)				
					1 代	2 代	3 代	4 代	5 代
自然合笼	4	26	18 (69.23 ^a)	14 (53.84 ^a)	8 (30.76 ^a)	3 (11.54 ^a)	1 (3.85 ^a)	1 (3.85 ^a)	-
超排处理	4	67	49 (73.13 ^a)	32 (47.76 ^a)	22 (32.83 ^a)	9 (13.43 ^a)	3 (4.47 ^a)	2 (2.99 ^a)	-

1): 表中百分比均以各组可用胚胎数为基数, 相同的字母表示差异不显著 ($p > 0.05$)。

4 结果

由表 1 可见,与自然发情相比,同样数量的雌兔超数排卵后可显著增加可用胚胎的数量,而且自然合笼组和超排组胚胎 96 h 贴壁率无显著差异($p>0.05$)。贴壁后的内细胞团有一部分不能继续增殖,随着培养时间的延长变小变黑并最终死亡;正常生长的内细胞团贴壁后培养 3~4 d 后成功传代。自然合笼组和超排处理组中可传代的内细胞团(Inner Cell Mass, ICM)个数以及传不同代数对应的内细胞团个数均无显著差异($p>0.05$)。

5 讨论

超数排卵是使用促卵泡素(FSH)和促黄体素(LH)人工诱导动物排卵周期,使同一卵泡波形成多个可以授精的卵子。超排技术已经成功地运用于奶牛等经济动物的生产,极大提高了良种家畜的繁育数量和繁殖速度,带来了巨大的经济效益。在胚胎发育的研究中,为了一次获得较多数量的样本,同时避免发情周期制约实验进程,常对实验对象进行超排处理。超排技术已经广泛运用于小鼠胚胎干细胞的研究中。兔子的超排也有大量的研究。但是兔子超排的研究着重考察的是超排的直接效果即排卵数量和形成胚胎的数量^[1,2],并没有对胚胎质量及其发育能力做进一步的研究,超排对兔胚胎体外发育有何影响也是未知的。从小鼠超排得到的资料看,超排对胚胎的影响似乎是显而易见的^[3]。超排所使用的高浓度激素可能影响卵泡的正常发育过程^[4],使受精后合子的发育信号延迟或超前;另外,虽然有报道认为交配不受超排影响,但是其考察的是交配后形成二细胞胚或四细胞胚过程^[5]。本实验中超排后 72 h 形成的胚胎大多处于桑椹胚阶段,此阶段考察超排对胚胎体外发育的影响能更充分说明激素对胚胎发育的长远影响。

本实验中对兔进行超排处理获得了大量的胚胎,但是这些胚胎发育阶段参差不齐。交配后 72 h 所获得的胚胎有处于 2 细胞期、4 细胞期的,有处于桑椹胚的,有的胚胎透明带明显弯曲变形,整个胚胎形状不规则。这些异常的胚胎常常占所收集胚胎的 30%以上。这些胚胎有的能在体外继

续发育至桑椹胚阶段,但不能发育至囊胚阶段,培养过程中自行死亡较多,除去外层粘蛋白和透明带后很少能够贴壁。

本实验主要目的是考察处于正常发育阶段的胚胎体外发育能力是否会受到超数排卵的影响。为避免这些发育不良的胚胎对实验结果产生干扰,对超排获得的胚胎进行了筛选和分级,选择那些所处发育阶段适当、形态正常、透明带完整、内细胞团细胞均匀的处于桑椹胚或囊胚阶段的胚胎用于体外培养。从表 1 可见,自然合笼组和超排组胚胎 96 h 贴壁率、初次成功传代的 ICM 比率以及传代数都没有显著差异($p>0.05$),说明兔子超排处理并没有对筛选后的家兔胚胎体外发育有显著影响。然而,超排后得到的胚胎虽然较多,能够初次成功传代的胚胎比率则较自然交配取得的胚胎要低(47.76% VS 53.84%, $p>0.05$),超排并没有对体外培养效率有明显的助益。如果把超排所收集的全部胚胎计算在内,则其贴壁率与可成功传代 ICM 比率就会明显低于自然合笼组。所以,更多的学者坚信,自然交配得到的胚胎更适宜分离胚胎干细胞^[6]。但是,兔子的发情状态受季节性影响显著,在严寒和酷热的环境下常常不能成功地自然交配,这也会阻碍实验研究的进程。因此,在兔子易发情的春秋季节时获得胚胎以自然交配为好,对家兔进行超排处理时,为保证实验的效率,需要对所收集的胚胎进行筛选,以保证胚胎质量。

参考文献:

- [1] 胡小九,孙新明,王炜.不同方法对不同年龄的家兔超排效果比较[J].动物医学进展,2001,22(114):71-73
- [2] 丁志丽,戴荣亮,周俊波,等.中国大白兔的超数排卵效果比较[J].河南畜牧兽医,2005,26(11):7-9
- [3] 严学勤,李光鹏,郑小民.发育生物学原理与胚胎工程[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995.250-257.
- [4] 张金友,田亚光,黄贺,等.兔超数排卵效果及早期胚胎体外发育的研究[J].中国畜牧杂志,2007,4(1):17-19.
- [5] 陈玉霞,史明艳,高腾云.不同处理方法对家兔超数排卵效果的影响[J].中国农学通报,2006,22(8):44-46.
- [6] Piedrahita J A, Anderson G B, Bondurant R H, et al. Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines[J]. Theriogenology, 1998, 29(1):286-290.

浅谈隔离检疫期间猪链球菌病的防治

康伟¹, 陈增荣²

(1. 广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510623; 2. 高明出入境检验检疫局, 广东 佛山 528500)

中图分类号: S852.61*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0021-03

近年来,我国大型养猪企业频频从世界养猪业发达国家和地区引进优良猪种,引种批次和数量逐年增多。根据《中华人民共和国进出境动植物检疫法》中的有关规定,进口种猪抵达入境机场后,不能马上运抵引种企业猪场,需要在出入境检验检疫机关指定的动物隔离检疫场隔离检疫45天。本文重点讨论的是在隔离检疫期间如何降低猪链球菌病发生的风险。

1 隔离检疫期间防控猪链球菌病的必要性

1.1 猪链球菌病简介 猪链球菌病是由不同群(D,L,R,S,T,U和V群)的多种链球菌感染引起的猪的一类传染病的总称,属一类人兽共患病。世界动物卫生组织(OIE)将猪链球菌病列为B类疫病,我国将其列为二类动物疫病。在猪链球菌众多血清型中,2型是猪的最主要病原,致病性最强。从表征健康的猪扁桃体内分离的所有猪链球菌中,2型多达50.6%。猪链球菌病临床表现为出血性败血症、心内膜炎、脑膜炎、关节炎、仔猪下痢和孕猪流产等。在临床上,急性型以脑炎或脑膜脑炎和败血症为主症,慢性型以关节炎、淋巴结脓肿为特征。本病一年四季均可发生,以冬春季多发,不同年龄猪只均可发病。该病同时可通过破损皮肤如伤口或擦伤传染给人,也可通过呼吸道感染人,严重感染时可引起人的死亡。控制猪链球菌病的感染,重在预防。

1.2 猪链球菌病对种猪的危害

1.2.1 猪链球菌病死亡率高,急性感染后,易引起猪只死亡。种猪经济价值较高,每头美国原种杜洛克猪的价格约为6 000~8 000美元,如果出现猪链球菌病疫情,将给引种企业造成巨大的经济损失。

1.2.2 猪链球菌病的慢性感染危害也不容小视。慢性型以关节炎为特征,造成种猪关节肿大,跛行,残疾。种猪,以其种用价值为主要特征,公猪患

链球菌病后,关节肿胀,跛行,导致运动机能下降,精子品质降低,种用价值降低,严重的甚至无法爬跨,丧失种用价值。

1.2.3 由于引种企业育种体系需要,引种的猪只既有成猪,也有仔猪。仔猪被链球菌感染后,会出现严重腹泻,即使经过治疗后存活,也很容易形成僵猪,严重影响猪只生产性能,进而影响企业配种计划,间接影响企业经济效益,给企业造成损失。

1.3 隔离检疫期间猪链球菌病的发生风险

1.3.1 国外疫病传入隔离检疫场 猪链球菌2型在澳洲、美国、加拿大、丹麦以及北美和北欧其他国家均有发生,造成重大损失。而中国内地引种目的国多为北美和欧洲。虽然进口种猪在国外都经过严格的预检,但不可排除种猪在国外口岸装载、运输过程感染链球菌,并携带入境的可能。带菌种猪在健康猪群中可通过口、鼻、皮肤伤口等传播途径感染其他猪只。

1.3.2 国内疫病传入隔离检疫场 近年来,我国猪链球菌病流行区域不断扩大,发病率持续升高。在江苏、四川等省份均发生过疫情,如1999年江苏地区爆发猪链球菌病疫情,发病猪只死亡率达到50%;2005年四川爆发人感染猪链球菌病疫情,共发病181例,死亡34例,病危31例。猪链球菌病传播途径较多,因此,该病传入隔离检疫场的风险较大。

1.3.3 隔离检疫场可能作为风险源 有个别隔离检疫场建场至今已经20年了,有的甚至已经使用了30年,隔离检疫过的种猪不计其数。即使防疫消毒工作做得很好,也不能保证栏舍内没有链球菌的存在,一旦气候环境许可,就有可能感染种猪,危害猪群健康。

1.3.4 气候环境和饲养管理水平也是引起猪群发病的重要因素 如果进口种猪在夏季进入隔离检疫场隔离检疫,潮湿的气候,高温高湿的环境可

以导致疫情发生风险显著升高;外界气温剧变,特别是春秋季节,早晚温差大,容易引起该病发生。此外,如不及时清理栏舍卫生,造成粪便堆积、微生物滋生、舍内湿度增大、空气卫生环境水平下降等应激因子使动物的抵抗力降低时,均可诱发该病。昆虫媒介在疾病的传播中也起到重要作用,蚊、蝇等通过飞行传播病原菌。

1.3.5 其他原因 如种猪进境前隔离场消毒防疫工作不到位、隔离检疫期间监管工作不到位、没有进行必要的免疫工作、CIQ (China Inspection and Quarantine, CIQ) 驻场兽医业务水平不高,没有及时发现诊断病猪、病例发生后没有及时做好防疫消毒工作,造成疫情蔓延,爆发等等。

2 隔离检疫期间防控猪链球菌病的措施

2.1 种猪进场前的消毒措施 为降低动物隔离检疫场潜在的带菌风险,动物进境前十天,开始清洁栏舍和消毒工作。常用的消毒药在 1 min 内即可杀死猪链球菌 2 型,但污物和有机质的存在会影响化学消毒药对细菌的杀灭作用,所以采用先清洗隔离栏舍后消毒的策略是非常重要的。按照规定的浓度使用不同作用机理的消毒药物,对整个隔离区域(包括隔离场内主要道路、栏舍、墙壁、屋内顶、喂料通道、粪池、粪道、装卸台、各种用具)消毒三次,每次间隔三天。在完成三次消毒后,用烧碱再做一次全场消毒。第一次消毒工作完毕后,在进入隔离场的大门设消毒池,对进场车辆以及人员进行车轮和鞋底消毒,在通往隔离栏舍的通道上设紫外线消毒间,在通道进门以及进入隔离栏舍前各设消毒池一个。消毒液三天一换。严禁无关人员进出隔离检疫区域。

2.2 种猪进场当天的消毒工作 为防止链球菌病传入隔离检疫场,在运输种猪车队必经之路铺设石灰,监督检查各个消毒池,添加消毒液,确保消毒效果。装载动物的车辆到来时,应由出入境检验检疫局专业技术人员对车辆进行消毒,特别是对车轮、车辆底部,遮雨篷布等部位要仔细作业。

2.3 隔离检疫期间的消毒防疫工作 在隔离检疫期间,对动物隔离栏舍及通道每三天进行一次消毒,每两天对动物栏舍进行带动物消毒一次,在人员出入较多的情况下如装卸动物、采血、皮试时以及发现有动物染病或出现疑似病例的情况下,应采取临时应急消毒。

2.4 检验检疫机构驻场兽医对猪链球菌病的风

险控制 在隔离检疫期间,官方驻场兽医应每天对种猪进行临床检查,如发现疑似病例,应及时将病猪隔离,并做好应急消毒,协助企业兽医做好病猪诊疗工作。如有动物死亡,应剖检尸体,采样送检,并按规定对尸体深埋,铺撒生石灰或做无害化处理。如发现猪链球菌病阳性猪只,应及时将其分圈,隔离饲养,按有关法律规定做扑杀或退回处理。对于种猪群的免疫,需制定猪链球菌病免疫计划,对于疫苗选定,注射时间,免疫次数等细节,需与货主方商定,建议使用猪链球菌病氢氧化铝胶三价灭活菌苗^[1]。经实验室和田间试验证实,该疫苗安全性好、免疫效力高。弱毒苗虽然免疫效果好,但是其本身也是疫病发生的风险源,广东某猪场曾发生用弱毒苗免疫造成链球菌病爆发的案例。此外,官方兽医还要监督管理栏舍环境卫生,保持栏舍清洁、干爽。在寒冷的冬季,要做好保温措施;在夏天,隔离场栏舍内要放置大型鼓风机,降低湿度和温度。对企业工作人员的行为进行规范,严格控制人员进出隔离场,要求饲养员进出栏舍必须淋浴、更衣。进入栏舍,经沐浴后,穿着隔离检疫服、雨鞋,鞋底要在消毒池消毒;出栏时,经淋浴清洗后换上便服,不得把隔离检疫服、雨鞋穿出更衣室。隔离检疫期,所有人员禁止食用猪肉。为防止本病通过病媒生物传播给隔离猪群,隔离场必须做好灭鼠,防蚊蝇工作,通过化学灭鼠法、物理灭虫法、化学杀虫法等具体方法予以实施。在日常饲养管理中建议饲养员定期在饲料、饮水中进行保健性投药,如在饮水中添加适可耐、黄芪多糖来增强猪只免疫力,在饲料中添加药物预混剂,如阿莫西林、磺胺嘧啶钠等药物。

3 隔离检疫期间发生猪链球菌病的治疗

防控工作做到位,可以降低该病发生的风险,但是不能保证完全杜绝该病发生。因此,如果有猪只感染链球菌病,必须准确诊断,确定患病类型,找出病因,合理给药。下面就猪链球菌病三种常见类型具体分析。

3.1 急性败血型

3.1.1 发病特征 好发于种仔猪,病猪高热,体温常在 41℃ 以上,呈稽留热,同时伴有明显的全身症状:精神差,食欲废绝,眼结膜潮红、流泪,鼻镜干燥龟裂,呼吸急促,脉搏增数,病猪耳、胸部、腹部出现红斑或紫斑,充血或潮红。粪便干燥,表面常带有血液或粘液。

3.1.2 治疗 选择对猪链球菌敏感的抗菌药物, 可通过药敏试验, 筛选敏感抗菌药^[2]。从理论上讲, 猪链球菌对普通消毒药抵抗力不强, 但从药敏反应来看, 猪链球菌菌株对许多常用抗菌素如青霉素、庆大霉素、阿莫西林都有抗药性。对败血症型宜选用大剂量氨苄青霉素辅以地塞米松进行治疗, 高热的可以联合注射复方氨基比林, 烦躁不安的亦可加注安乃近, 并根据需要进行支持治疗。

3.2 脑膜脑炎型

3.2.1 发病特征 好发于仔种猪, 育成猪。病初体温升高, 食欲废绝, 粪便干燥, 流鼻液, 继而出现神经症状, 共济失调, 转圈、磨牙、仰卧, 角弓反张, 四肢呈划水状, 甚至呈昏迷状态。

3.2.2 治疗 应用大剂量磺胺嘧啶钠(磺胺类药物可以透过血-脑屏障)联合维生素 B1(修复受损脑组织)肌肉注射, 或使用大安注射液、氯丙素注射液肌注治疗效果也不错。

3.3 关节炎型

3.3.1 发病特征 仔猪少见, 多发于育成猪、成猪。主要表现是腕关节和后肢跗关节出现不同程度的肿胀, 病猪腿不敢着地, 常出现明显的跛行。体温一般正常或者偏高, 食欲正常或偏差, 精神尚可, 该型呈慢性进展过程。

3.3.2 治疗 选用大剂量氨苄青霉素联合安痛

定肌肉注射, 对患处涂抹消炎刺激剂。

4 讨论

引进国外优良品种猪并通过繁育、杂交配种等方式改良我国现有品种商品猪, 提高了我国养猪行业水平, 有利于我国畜牧业的发展。鉴于国内外猪链球菌病疫情复杂, 种猪经济价值和使用价值高, 如果在隔离检疫期间爆发链球菌病疫情, 后果不堪设想。因此, 在隔离检疫期间充分做好疫病防控工作十分必要。首先, 要落实好防疫消毒制度, 其次, 要做好临床诊断治疗工作和善后工作, 再次, 隔离检疫期间饲养管理也是十分重要的。从 2000 年至今, 广州出入境检验检疫局动植物隔离场共隔离检疫进口种猪 40 多批、20 000 多头, 从未发生猪链球菌病疫情, 正是因为做到了以上三点。防控工作可以降低疫情发生的风险, 临床诊疗工作可以堵住漏洞, 减少损失, 隔离检疫期间做好猪链球菌病的防治工作需要出入境检验检疫机关和进口种猪企业密切配合, 方能取得良好的工作成效。

参考文献:

- [1] 王华, 赵云玲, 王君玮, 等. 猪链球菌病流行病学及其疫苗研究现状[J]. 动物医学进展, 2006, (9): 27.
- [2] 李卓, 孙光, 杨本, 等. 猪链球菌病及其防治[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005, (8): 14-15.

2011“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 2011 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 2012 年第 1 期公布。

1、**评选范围:** 本刊 2011 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

二〇一一年一月十四日

生猪宰后组织器官物理性出血与病理性出血的感官鉴别

梁木寿

(深圳市肉品卫生检验所, 广东 深圳 518005)

中图分类号: S853.44'9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0024-02

在宰后检验中我们经常看到生猪的某些组织器官出现出血的现象,其中有些是病理性的,也有很大部份是由运输、屠宰等过程中某些物理性因素造成的。深圳市肉品卫生检验所的检验数据显示:五丰食品(深圳)有限公司清水河肉联厂1991年7月至2001年12月间采用麻电法屠宰的生猪中皮肤出血的检出率为18%,肌肉出血(暗红肉)的检出率为16%,脂肪出血(红膘)的检出率为20%,肺脏出血的检出率为32%,肾脏出血的检出率为13%,肝脏出血的检出率为17%,脾脏出血的检出率为8%。2002年1月至2010年10月间采用活挂法屠宰的生猪中皮肤出血的检出率为4%,肌肉出血的检出率为6%,脂肪出血的检出率为8%,肺脏出血的检出率为7%,肾脏出血的检出率为0.6%,肝脏出血的检出率为2%,脾脏出血的检出率为0.4%。由以上数据可见屠宰加工等过程中某些物理因素对生猪宰后的组织器官变化有很大的影响。如何对生猪宰后组织器官常见的物理性与病理性出血在感官上作出鉴别诊断,笔者结合自己二十多年的现场检疫工作,对以下方面作一探讨:

1 淋巴结的出血

1.1 物理性淋巴结出血 主要由于外力撞击或麻电不当引起的局限性淋巴结出血。当猪体外伤时,受伤部位附近的淋巴结出血;麻电不当引起的淋巴结出血多见于头颈部的淋巴结。物理性淋巴结出血多表现为边缘出血,呈圆圈状,鲜红色,特点是淋巴结不肿大。

1.2 病理性淋巴结出血 多见于急性传染病。表现为全身淋巴结肿大、富有光泽、具深红色至红黑色外观。随疾病的不同,其病变往往也各具一定的特征:败血型猪瘟淋巴结外观黑色,切面边缘的皮质出血而位于中央的髓质不出血,形成大理石花

纹;败血型猪肺疫淋巴结外观深红色,整个切面出血,呈红色、多汁;败血型猪丹毒淋巴结外观呈弥漫性紫红色,切面有小点状出血。

2 皮肤的出血

2.1 出血点

2.1.1 物理性皮肤出血点 主要由麻电引起的出血点,多见于肩部和臀部皮肤。表现为界限不清的鲜红色放射状小点出血,不呈大面积弥漫性。

2.1.2 病理性皮肤出血点 由猪瘟、猪弓形虫病等引起的出血点,多见于四肢和腹部皮肤,表现为紫黑色大小不一的出血点,有时出血点密集,成出血斑。

2.2 出血斑

2.2.1 物理性皮肤出血斑 主要由驱赶、鞭打等外伤引起的出血斑,多见于背部和臀部皮肤。表现为纵横交错的紫红色条痕或斑块,这种出血有时深入皮下组织。此外还有运输过程引起的充血斑和麻电不足即行泡烫引起的弥漫性红染。前者多见于背部皮肤,是由于运输过程中冷空气突袭或烈日下暴晒引起的淡红色充血斑块;后者全身皮肤均可见,表现为鲜红色的红斑,呈大面积的弥漫状。

2.2.2 病理性皮肤出血斑 主要由败血型疫病引起的出血斑。败血型猪肺疫的出血斑多见于耳根、颈部、腹部和四肢内侧皮肤,表现为弥漫性暗红色出血斑。败血型猪丹毒会引起充血斑,多见于胸部、腹部、腋下和股内等处皮肤,表现为多发性大小形状不一的紫红色充血斑块。

3 肌肉的出血(暗红肉)

3.1 物理性暗红肉 主要由于宰前饲养管理不善或屠宰过程中麻电不当造成。表现为局部肌肉(以躯干肌、肋间肌、膈肌多见)乃至全身肌肉颜色

变暗，切开可见有散在性针尖状至绿豆大鲜红色出血点或出血斑，血管内有血液滞留，滞留的血液较新鲜。

3.2 病理性暗红肉 多为败血性疾病引起的肌肉出血。切开肌肉可见有出血点，其颜色暗红，血管内少见有血液滞留。猪瘟的肌肉有大小不匀的紫黑色针尖状出血或淤斑状出血；猪肺疫的肌肉密集分布有红褐色的淤点状出血。

4 脂肪的出血(红膘肉)

4.1 物理性红膘肉 主要受冷热天气刺激或屠宰加工不当引起。表现为全身皮下脂肪红染，色泽均匀一致。内脏、淋巴结也有轻微的红染，无明显的病理变化。肉体经清水冲洗后在低温下放置一段时间，红色能减退或完全消失。

4.2 病理性红膘肉 多因猪瘟、猪丹毒、猪肺疫等败血型传染病引起。一般只有部分或大部分脂肪红染，其程度也不一致并有明显的界限。内脏器官、淋巴结不红染，有明显的病理变化。肉尸用清水冲洗和低温放置后仍不褪色或变化不大。

5 肺脏的出血

5.1 物理性肺出血 多见于麻电引起的肺出血。在肺表面有散在性或密集成片的针尖状至豆粒大出血点，呈鲜红色，一般分布在膈叶背缘的肺胸膜下，有时心叶、尖叶边缘也可发生。断面鲜红色或暗红色，肺实质和小叶间质无肿胀、变性、坏死等变化，肺门淋巴结正常。

5.2 病理性肺出血 多由败血型疾病引起的肺出血。外观肺表面呈红色或暗红色，出血部呈黑红色，常伴有肺淤血、肺水肿或其它肺部炎症；肺门淋巴结肿大、充血或出血。肺出血的大小形状因病因不同而各异。败血型猪瘟呈紫红色的点状出血；败血型猪肺疫呈楔形出血，可见红色、灰色肝变区；败血型猪丹毒的肺脏淤血、水肿，伴有红色的点状出血。

6 肾脏的出血

6.1 物理性肾出血 常见于麻电不当或鞭打猪体、冷热刺激、惊吓等因素引起。表现为肾不肿大，颜色正常，表面和切面皮质部可见散在的针尖状大小不一的红色出血点。

6.2 病理性肾出血 传染病、中毒病和某些寄生虫病均可引起肾出血，病因不同其表现有异。败血型猪瘟肾脏稍肿大，实质变性，色泽变淡甚至苍

白，表面、切面有散在的紫黑色点状出血，外观似麻雀卵壳样；败血型猪肺疫肾脏不肿大，充血而整个肾呈暗红色；败血型猪丹毒肾脏显著肿大，呈弥漫性暗红色或蓝紫色，纵切面皮质部有红色小出血点；猪弓形虫病肾脏稍肿大，实质稍松软，呈淡红黄色或灰黄色，表面及切面散布少量小出血点，偶见灰白色、高粱米粒大的病灶。

7 心脏的出血

7.1 物理性心出血 多见于宰杀时电麻性出血，或由于宰杀不当造成高度呼吸困难出现窒息性出血浸润。表现为在心外膜局部，特别在主动脉瓣附近有少量的散在性新鲜出血点或出血性浸润，其它实质无变化。

7.2 病理性心出血 多见于各种出血性败血症，如猪瘟、猪肺疫。表现为在冠状沟、纵沟、心外膜、瓣膜等处有散在的针尖大小出血点或溢血斑，严重时呈弥漫性喷洒状出血，心室扩张，心肌松软易碎，切面无光泽，心内膜血液浸润，心室充满大量黑紫色血液。

8 肝脏的出血

8.1 物理性肝出血 多见于麻电引起的肝出血。表现在肝表面仅有少量鲜红色小出血点。因出血点小，在肝实质的暗色背景上不容易被发现，肝脏色泽、质地及淋巴结均正常。

8.2 病理性肝出血 多见于急性传染病和寄生虫病引起的肝出血。猪瘟、副伤寒等急性传染病的肝脏稍肿大，外形呈深红褐色，质脆，肝包膜下或切面有散在或弥漫性暗紫色出血点，胆囊粘膜也有出血点，肝门淋巴结切面出血；肝脏有线条状弯曲的出血变化，多由某些寄生虫在肝内移行引起。

9 脾脏的出血

9.1 物理性脾出血 多为麻电性出血和创伤性出血。麻电性脾出血在脾被膜下有散在的鲜红色出血点，脾实质及脾门淋巴结均正常。创伤性脾出血在创缘处有凝血块和梗死。此外，屠宰时某些应激因素或放血不全会引起充血脾或淤血脾。

9.2 病理性脾出血 多见于传染病引起的脾出血。急性猪瘟的脾脏不肿大，在脾边缘出现大小不一、呈结节的出血性梗死灶，被膜下散发出血点；急性猪沙门氏菌病的脾脏肿大，色暗带蓝，被膜下有散发性出血点，切面蓝红色；急性猪丹毒的脾脏显著肿大，呈樱桃红色，切面脾白髓周围鲜红色出血。

猪瘟病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立

赵明秋, 王伟芳, 王波, 康艳梅, 高健潜, 陈金顶*
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过对 GenBank 中注册的 CSFV 序列进行比对分析, 针对 CSFV N^{pro}/C 基因中的保守区域, 设计合成了一套 RT-LAMP 引物, 应用含有 N^{pro}/C 基因的阳性质粒株对 RT-LAMP 引物进行验证。在成功扩增出特异片段的基础上, 用 CSFV RNA 优化 RT-LAMP 反应体系和条件, 建立了 CSFV 的可视化 RT-LAMP 快速检测方法。对建立的方法进行特异性和敏感性试验, 结果显示, 所建立的方法能够特异地检测出 CSFV RNA, 检测 PRRSV、FMDV 和 JEV RNA 均为阴性, 并且可检测低至 0.1pg/μL 浓度的 CSFV RNA。

关键词: 猪瘟病毒; RT-LAMP; 快速诊断

中图分类号: S852.65¹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0026-03

Establishment of RT-LAMP method for detection of CSFV

Zhao Mingqiu, Wang Weifang, Wang Bo, Kang Yanmei, Gao Jianqian, Chen Jinding*
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A suit of primers were designed according to a part of N^{pro}/C genes of CSFV from GenBank. The specific fragments were amplified from positive plasmid pMD-CSFV using LAMP method. The RT-LAMP reaction system and condition were optimized with CSFV RNA, so a visualized RT-LAMP method was established. The results showed that CSFV RNA could be detected specifically and the RNA of PRRSV, FMDV and JEV all were detected negative. As low as 0.1pg/μL CSFV RNA could be detected.

Key words: Classical swine fever virus; RT-LAMP; rapid detection

猪瘟(Classical swine fever,CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起的一种高发病率和高死亡率的烈性传染病。该病在世界范围内流行,是动物卫生组织要求申报的动物传染病之一,我国将其列为一类传染病^[1]。近年来,该病在美洲、亚洲、欧洲等国家和地区呈现散发的趋势,一些宣布已消灭 CSF 的国家如法国、荷兰、德国、比利时等又见 CSF 复发的报道^[2]。

目前,CSFV 的检测方法有常规方法如病毒的分离鉴定^[3];血清学诊断方法如兔体交互免疫试验^[4]、免疫荧光试验^[5]、酶联免疫吸附试验(ELISA)等^[6-7];分子生物学检测方法如 RT-PCR 法^[8]、实时荧光定量 RT-PCR(Real time RT-PCR)等。但病毒分离鉴定步骤比较繁琐,所需时间长;血清学试验

敏感性差,检出率低,容易出现假阳性;而分子生物学检测常需 PCR 扩增仪等特殊仪器,操作复杂,成本高,不适合在基层应用。为了提高检测的准确性,缩短检测时间,降低检测成本,本研究采用一种新的核酸扩增技术,以 CSFV 部分 N^{pro}/C 基因为目的基因设计引物,在一个体系内同时反转录和环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)扩增出特异性片段,具有简便、快速、敏感性高和结果可视化等优点,从而达到了快速而敏感地检测 CSFV 的目的。

1 材料与方法

1.1 病毒株和菌株 CSFV T 株(Thiverval 株)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)、

收稿日期:2011-01-05

*:通讯作者

基金项目:国家自然科学基金项目(30771611、31072137);教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(TRT0723);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638)。

口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、猪乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 及 E. coli DH5 α 工程菌均由华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存。

1.2 主要试剂 Trizol、AMV、Rnase inhibitor、Ex Taq、限制性核酸内切酶 Neh I 和 DNA Marker2000 为 TAKARA 公司产品; Bst DNA 聚合酶为 NEB 公司产品; SYBR Green I 染料为北京自普博欣公司产品; Marker 100 为天根公司产品; NaCl、NaOH、MgSO₄、无水乙醇、氯仿、异丙醇等为国产分析纯。

1.3 引物 针对 CSFV 部分 N^{pro}/C 基因序列进行 RT-PCR 引物设计, RT-PCR 引物序列:

P1: 5' -AGGAGTGGCAACCATCTAG-3',

P2: 5' -GCCGTCTTGGGTATTCTT-3';

RT-LAMP 引物序列:

F3: 5' -GGCCCGGTCTACCATAGG-3',

B3: 5' -TCTGGCTTCTTCTCTTACTTCC-3',

FIP: 5' -CAACCATCGATGCACACATATATATG-GTTGAGACGCAGTTTGTGAGGTGAC-3',

BIP: 5' -CAAGAGAGGCGAGCCAAGAACCTTCC-CACAATGGACAGTCGGTGAA-3',

上述引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 阳性质粒的制备 利用 Trizol 分离 CSFV RNA, 以 P2 为引物进行反转录, 合成 cDNA 模板, 再以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。将扩增产物回收、连接、转化后, 再进行重组质粒的筛选和鉴定, 将获得的阳性重组质粒命名为 pMD-CSFV。

1.5 RT-LAMP 引物的验证 以 F3、B3、FIP 和 BIP 为引物, pMD-CSFV 质粒为模板进行 LAMP 反应, 同时以蒸馏水为模板作空白对照, 根据普通 LAMP 的反应体系进行扩增。反应结束后, 在体系中加入 1:10 稀释的 SYBR GREEN I (10 000 \times) 1 μ L, 若结果为阳性, 则肉眼观察可见绿色荧光, 反之则为橙色荧光。将 LAMP 产物采用限制性内切酶 Neh I 进行酶切鉴定, 所得酶切片段大小预计为 150 bp 左右。37 $^{\circ}$ C 反应过夜后, 取 5 μ L 酶切产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳并观察结果。

1.6 病毒 RNA 的提取 参照 Trizol 使用说明书提取 CSFV、PRRSV、FMDV、JEV 的 RNA。

1.7 RT-LAMP 反应体系的建立及优化 以抽

提所得的 CSFV RNA 与 AMV 以 4:1 比例混合物为模板, 根据反应体系优化策略, 对 MgSO₄、Betaine、Bst DNA Polymerase、dNTP、使用的 2 对引物等组分分别进行了优化; 根据引物 T_m 值, 将温度按 60 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、63 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 依次递增, 从多次重复试验中确定最佳反应温度; 以最佳反应温度, 将反应时间按 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min 递增, 从多次重复试验中确定最佳反应时间。

1.8 RT-LAMP 方法的特异性 采用优化的 RT-LAMP 方法对 PRRSV、FMDV、JEV 等病毒的 RNA 进行检测, 对所建立的 RT-LAMP 方法的特异性进行评估。

1.9 RT-LAMP 方法的敏感性 将浓度约为 1 μ g/mL 的 CSFV RNA, 分别以 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 进行倍比稀释, 采用优化的反应体系和反应条件, 检验所建立的 RT-LAMP 方法的敏感性。

1.10 RT-LAMP 方法的重复性和稳定性 用同一次分离的 CSFV RNA 作为模板进行 RT-LAMP 扩增 6 次, 观察结果; 然后再以不同时间提取的 CSFV RNA 作为模板进行 RT-LAMP 扩增 6 次, 观察结果。确定所建立 RT-LAMP 方法的重复性和稳定性。

2 结果

2.1 RT-LAMP 引物的验证 以 pMD-CSFV 质粒和水为模板, 进行 LAMP 反应, 再用 SYBR Green I 染料进行可视化处理, 1 号管阳性样品得到绿色产物, 2 号管阴性样品为橙色产物 (图 1); 将以阳性质粒作为模板的产物用 Neh I 酶切得到与预期理论值相符的片段, 为 150 bp 左右 (图 2), 结果表明设计的引物对 CSFV 基因可以进行扩增。

2.2 反应体系和反应条件的优化 猪瘟疫病毒 RT-LAMP 的反应体系为 25 μ L, 反应体系和反应



图 1 LAMP 的可视化结果

1: pMD-CSFV 质粒; 2: 阴性反应

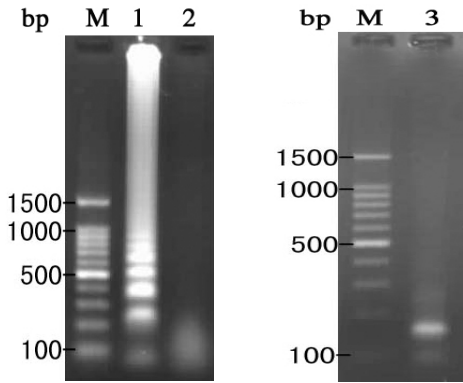


图2 电泳分析 LAMP 反应产物和 NotI 酶切产物
M:Marker 100; 1:LAMP 阳性扩增产物;
2:LAMP 阴性扩增产物; 3:阳性扩增的酶切产物

条件分别进行调整优化后各组分的终浓度为:FIP (10 μmol/L) 和 BIP (10 μmol/L) 各 2 μL、F3 (10 μmol/L) 和 B3 (10 μmol/L) 各 0.8 μL、dNTPs (2.5 mmol/L) 3 μL、Betaine (10 μmol/L) 3 μL、10 × ThermoPol Buffer 2.5 μL、MgSO₄ (100 mmol/L) 1 μL、Bst DNA Polymerase (8U/μL) 1 μL、Template 5 μL,加 DEPC 水至 25 μL。充分混匀后,42℃ 反应 10 min,65℃ 反应 1 h,80℃ 作用 10 min 灭活。

2.3 RT-LAMP 方法的特异性验证 应用 RT-LAMP 方法对 PRRSV、FMDV、JEV 和 CSFV 的 RNA 进行检测,结果显示:只有 2 号管 CSFV RNA 样品有相应的绿色荧光出现(图 3),其它病毒 RNA 均为橙色。结果表明本研究建立的 RT-LAMP 方法能特异检测 CSFV RNA,而对 PRRSV 等病毒 RNA 不能检出。

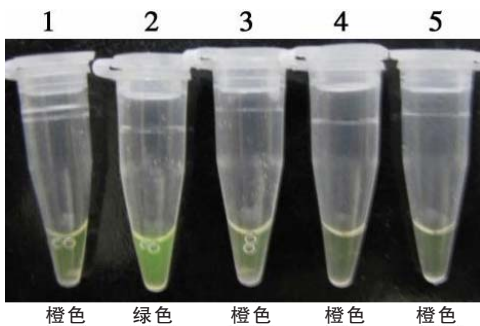


图3 RT-LAMP 的特异性检测结果
1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: PRRSV; 4: FMDV; 5: JEV

2.4 RT-LAMP 方法的敏感性 图 4 中 1 号管为阴性对照,反应产物呈橙色,从 2 号管开始到 7 号管,对 CSFV RNA 依次做 10 倍稀释,可以看到反应产物颜色随 CSFV RNA 浓度降低,绿色变淡,到

第 5 号管有稍浅的绿色,表明所建立的 RT-LAMP 方法的检测阈值约为 1 μg/mL CSFV RNA 的 10⁴ 倍稀释度,CSFV RNA 的总含量约为 0.1 pg。

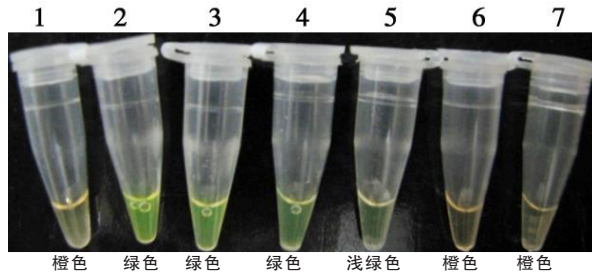


图4 RT-LAMP 敏感性检测结果

1: 阴性对照; 2:10 倍稀释; 3:10² 倍稀释; 4:10³ 倍稀释; 5:10⁴ 倍稀释; 6:10⁵ 倍稀释; 7:10⁶ 倍稀释

3 讨论

日本学者 Notomi 等^[9]建立的新型核酸扩增方法,即环介导等温扩增,已经被广泛用于细菌、病毒和寄生虫等的检测,动物胚胎性别鉴定,食品卫生检疫及基因芯片的开发等,尤其在病毒病的快速诊断方面发展迅速,可对多种病毒进行检测和鉴定,成为最有发展前景的快速诊断方法^[10]。RT-LAMP 则是基于 LAMP 建立的 RNA 分子检测技术^[11]。

与常规 RT-PCR 相比,可视化 RT-LAMP 更容易操作,不需要昂贵的 PCR 仪,只需要水浴锅或者可以维持在 64℃ 的加热平台即可。同时,可视化 RT-LAMP 比常规 RT-PCR 更有效快速,一般 RT-PCR 反应及产物检测需要 4 h,但是可视化 LAMP 可以在 2 h 内完成反应及产物检测,并且产物的检测不需要繁琐的凝胶电泳操作,只需要肉眼观察即可。此外,RT-LAMP 扩增效率非常高,还可以使用非变性的 DNA 做为模板,不需要对模板进行 95℃ 的变性操作,整个反应过程恒温即可完成。

RT-LAMP 引物的设计比 PCR 复杂和巧妙,它是针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异的引物。正向内引物 FIP 中 F1c 和 F2 之间及反向内引物 BIP 中 B1c 和 B2 之间通常用连接子 TTTT 连接。本研究设计的引物,经 LAMP 扩增验证,能成功扩增出相应的 DNA 目的片段,所以在实际的 RT-LAMP 扩增过程中,能实现对 CSFV RNA 检测的目的。

RT-LAMP 原理中所特有的四个引物对应扩增序列上的六个区域是特异性的保证。在这里我们使用同一引物对 PRRSV、FMDV 和 JEV 同时进行

(下转第 32 页)

凝集试验检测兰氏 D 群链球菌血清抗体方法的建立

郭沈涛, 司徒剑谋, 余玲娜, 游启有, 杨 球, 以体强, 张毓金
(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 建立凝集试验, 用于检测兰氏 D 群链球菌血清抗体。采用兰氏 D 群链球菌 C55914 株制成凝集试验抗原, 制备的抗原与兰氏 D 群链球菌兔高免阳性血清、猪正常免疫阳性血清发生凝集反应, 与健康兔阴性血清及健康猪阴性血清发生凝集反应, 与链球菌兰氏 C 群、兰氏 E 群、巴氏杆菌 A 群、B 群阳性血清呈阴性反应。试验证明, 凝集试验能够快速地检验出兰氏 D 群链球菌阳性血清, 可用于兰氏 D 群链球菌抗体的定性检测, 及兰氏 D 群链球菌抗体阴性猪的筛选。

关键词: 兰氏 D 群链球菌; 平板凝集; 建立

中图分类号: S852.61*1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2011)02-0029-04

Agglutination test for detection of the serum antibody of Lancefield group D Streptococcus

Guo Shentao, Situ Jianmou, Yu Lingna, You Qiyou, Yang Qiu, Yi Tiqiang, Zhang Yujin
(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co. LTD., Guangzhou 511356, China)

Abstract: The agglutination test was established for the detection of the serum antibody of Lancefield group D Streptococcus. The Lancefield group D streptococcus strain C55914 was used as the antigen for agglutination test. The prepared antigen could agglutinate with the hyperimmune sera from rabbits or the immunized positive sera from pigs and did not agglutinate with the negative sera from rabbits or pigs. The antigen did not agglutinate with the positive serum of Lancefield group C and group E Streptococcus or the positive serum of capsular group A and group B of Pasteurella multocida. The results showed that the established agglutination test could detect the positive serum of Lancefield group D streptococcus quickly and could be used for the qualitative detection of Lancefield group D streptococcal antibodies and the screening of the Lancefield group D streptococcus antibody negative pigs.

Key words: Lancefield group D streptococcus; agglutination; establishment

猪链球菌病是一种人畜共患的急性、热性传染病, 由 C、D、E 及 L 群链球菌引起的猪的多种疾病的总称。表现为急性出血性败血症、心内膜炎、脑膜炎、关节炎、哺乳仔猪下痢和孕猪流产等。从发病猪中分离到的链球菌大多属于有限的几个血清型, 通常为 1-8 型^[1]。兰氏 D 群链球菌是猪链球菌的一种^[2,3], 根据荚膜多糖分型, 可分为 11 个血清型^[4,5]。主要引起为猪的关节炎、脑膜炎, 此外还能引起母猪繁殖障碍^[6-8]。

在流行病学调查及疾病的诊断工作中, 简便、快速、准确的血清学方法, 是一个重要的手段。我们的研究旨在使用自制的兰氏 D 群链球菌抗原,

建立平板凝集试验, 能够有效检测出猪体中的兰氏 D 群链球菌抗体, 为实验动物的选择及抗体水平的检测, 提供了一个快速、准确的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 兰氏 D 群链球菌 C55914 株及兰氏 E 群链球菌 C55949 株, 购于中国兽药药品监察所。

1.1.2 培养基 链球菌培养基, 购于青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 疫苗 猪败血性链球菌病活疫苗 (ST171 株)、猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (CA 株)、猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (E0630 株), 均由广东永顺

生物制药有限公司提供。

1.1.4 血清 各菌株阳性血清, 由本实验室制备; 非免猪血清, 为未免疫细菌疫苗的健康猪血清; 非免兔血清, 为健康新西兰兔血清, 均由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 兰氏D群链球菌凝集抗原的制备 将兰氏D群链球菌 C55914 株接种于链球菌培养基, 37℃培养 12 h, 取样后加入 0.2% 甲醛溶液, 置 37℃灭活 24 h, 菌液灭活完全后, 5 000 rpm, 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 1/15M, pH7.6 的 PBS 重悬, 将重悬液按上述方法重新离心、洗涤一次, 最后沉淀用 PBS 重悬作为凝集阳性抗原, 置 2~8℃保存备用。

1.2.2 灭活抗原的制备 将 C55914、C55949 株培养后, 加入 0.2% 甲醛溶液, 置 37℃灭活 24 h, 待菌液灭活完全后作为制备阳性血清的抗原, 使用前加入 20% 氢氧化铝胶作为佐剂。

1.2.3 兰氏D群链球菌兔高免阳性血清制备 取 C55914 株灭活抗原, 加入 20% 氢氧化铝胶, 免疫健康新西兰兔 2 只, 2 mL/只。分别于首免后 7 d、14 d、21 d 用相同剂量的兰氏D群链球菌灭活抗原加强免疫, 于最后一次免疫 10 d 后采血, 分离血清, 置 56℃水浴灭活 30 min 后, 作为阳性血清。

1.2.4 各细菌阳性猪血清制备 用自制的兰氏D群链球菌灭活抗原 (C55914 株)、兰氏E群链球菌灭活抗原 (C55949 株)、猪败血性链球菌病活疫苗 (ST171 株)、猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (CA 株)、猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (E0630 株) 免疫健康猪各 2 头。灭活抗原每头猪肌肉注射 2 mL, 活疫苗则每头注射 1 头份。注射后于第 7 d, 第 14 d、第 21 d 用同样剂量的疫苗加强免疫。于最后一次免疫 14 d 后, 采血, 分离血清, 置 56℃水浴 30 min 处理后, 分别作为链球菌 D 群、E 群、C 群、巴氏杆菌荚膜 A 群、B 群阳性血清。

1.2.5 凝集试验方法的建立

1.2.5.1 凝集反应 取 96 孔 V 型凝集板, 每个孔加 25 μL 的生理盐水; 将原倍的待测血清 25 μL 加入第 1 孔, 混均, 吸取 25 μL 液体加入第 2 孔, 如此方法稀释至第 11 孔。阳性血清及阴性血清也按上述方法稀释。稀释后每孔加入 25 μL 的兰氏D群链球菌抗原, 第 12 孔为抗原对照。振荡混匀

后, 置 37℃反应 5~10 min 后观察结果。

1.2.5.2 抗原最佳浓度的选择 将制备的抗原用 PBS 稀释为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32, 用不同浓度的抗原按照 1.2.5.1 项方法与链球菌 D 群阳性猪血清进行凝集反应, 选择凝集试验中抗原的最佳浓度。

1.2.5.3 敏感性试验 根据 1.2.5.2 项试验结果, 取最佳浓度的抗原, 与兰氏D群链球菌兔高免血清、D 群链球菌猪阳性血清、健康兔阴性血清及健康猪阴性血清进行凝集反应, 观察反应结果。

1.2.5.4 特异性试验 取最佳浓度的抗原, 与兰氏D群链球菌猪阳性血清、链球菌 C 群、E 群、巴氏杆菌 A 群、B 群阳性血清进行凝集反应, 以非免猪血清为阴性对照。

1.2.6 临床应用 取自制的兰氏D群链球菌凝集抗原, 用建立的凝集试验方法检测 30 份临床猪血清样品, 同时以自制的兰氏D群链球菌猪阳性血清作为阳性对照, 验证其临床应用效果。

2 结果

2.1 抗原最佳浓度的选择 用不同浓度的抗原与链球菌 D 群阳性猪血清进行凝集反应。结果表明, 当抗原稀释倍数大于 1:8 时, 阳性血清的效价会降低。而抗原 8 倍稀释时对应的抗原含菌量为 5.0×10^9 CFU/mL, 因此最佳抗原浓度确定为抗原含菌量不低于 5.0×10^9 CFU/mL。结果详见表 1。

表 1 凝集试验抗原最佳浓度的确定

抗原 稀释 倍数	血清稀释倍数											对照
	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	
1:2	# ¹⁾	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
1:4	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
1:8	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
1:16	#	#	#	#	#	#	++	+	-	-	-	-
1:32	#	#	#	#	++	+	-	-	-	-	-	-

1): “#”: 菌体全部凝集, 形成一层均匀膜, 布满整个孔底。“+++”: 菌体在孔底形成一层薄膜, 或呈锯齿状, 面积比前者稍小。“++”: 菌体在孔底形成薄膜凝集, 边缘松散。“+”: 菌体在孔底呈散在凝集且不明显, 孔底有小圆点。“±”: 菌体沉于孔底, 但周围不光滑或中心有空斑。“-”: 菌体完全沉于孔底, 呈光滑的圆点。凝集反应在“++”或以上判为阳性反应。下表同。

2.2 敏感性试验 制备的抗原与兰氏D群链球菌兔高免阳性血清、猪高免阳性血清发生凝集反应, 不与健康兔阴性血清及健康猪阴性血清发生凝集反应。凝集现象为 V 型孔底部出现沙粒状沉

淀。结果详见表2。

表2 凝集试验D群链球菌阳性血清的敏感性测定

血清类型	血清稀释倍数											对照
	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	
D群猪血清	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
D群兔血清	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
非免猪血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
非免兔血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3 特异性试验 制备的兰氏D群链球菌抗原与链球菌C群、E群、巴氏杆菌A群、B群阳性血清呈阴性反应。结果详见表3。

表3 凝集试验的特异性反应

血清类型	血清稀释倍数											对照
	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	
链球菌D群	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	+	-
链球菌C群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
链球菌E群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
巴氏杆菌A群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
巴氏杆菌B群	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
非免猪血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.4 临床应用效果 30份临床猪血清样品用建立的凝集试验方法进行检测,结果有4份样品为抗体阳性,其余均为阴性反应,阳性率为13.33%。

3 讨论

3.1 猪链球菌病是由链球菌感染引起的猪重要传染病,主要引起猪的脑膜炎、胸膜炎、组织脓肿、关节炎、繁殖障碍等,发病率和死亡率高。致病性的链球菌分为6大类、20个兰氏血清型,各血清群间没有明显交叉免疫能力^[8]。在对猪链球菌病的控制方面,针对猪链球菌2型、链球菌C群的疫苗比较成熟,但国内目前还没有专门针对链球菌D群的疫苗。自上个世纪60年代以来,国内猪链球菌病在广西、广东、福建、湖南、江西、安徽、江苏和四川等地陆续发生。据资料统计,主要血清型为兰氏C群,其次为兰氏D群、E群。国外猪链球菌病在澳大利亚、日本、泰国、新加坡以及欧洲、美国、加拿大等20多个国家都有发生。在欧洲一些国家,可频繁分离到血清2型的链球菌^[9,10]。国内对猪链球菌致病菌的研究证实,以C群的兽疫链球菌为主,D群较少^[11]。美国、加拿大等国,从败血

症和脑炎患猪中分离的链球菌主要是兰氏D群。

3.2 针对兰氏D群链球菌的分离与鉴定,目前主要应用乳胶凝集的方法,而且该方法有商品化的乳胶凝集试剂盒,能够鉴定多个群的链球菌。KurI等的研究表明,所有的糖特异性凝集试验只限于检测猪链球菌D群菌株,而其他各群链球菌并没有表现出这些类型的血凝活性。糖特异性凝集更是链球菌致猪发病的一个重要机制^[12]。而在对兰氏D群链球菌的血清抗体鉴定方面,目前还没有成熟、统一的方法。本试验所制备的兰氏D群链球菌抗原,采用凝集方法,能有效确定血清中是否含有兰氏D群链球菌抗体,并且能有效区分与因其他细菌感染产生的抗体。该方法简单、快捷,结果容易判断。本试验能够对兰氏D群链球菌的血清抗体进行检测,可作为兰氏D群链球菌血清学鉴定的一个方法。

3.3 在对兰氏D群链球菌的研究中,选用有效的实验动物是进行试验必不可少的工作。而我国在针对该细菌的实验用动物的筛选还没有报道。本试验用自制的兰氏D群链球菌抗原,通过凝集试验,能够检测出猪体中的兰氏D群链球菌抗体,可作为实验动物选择的抗体检测方法。

参考文献:

- [1] Higgins R, Gottschalk M. Distribution of streptococcus suis capsular types in 2000[J]. Can Vet J, 2001, 42: 223.
- [2] Moor C E. Septicaemic infections in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield's group R, S, and T. Antonie van Leeuwenhoek J[J]. Microbiol, 1963, 29: 272-280.
- [3] Elliott S D, McCarty M, Lancefield R C. Teichoic acids of group D streptococci with special reference to strains from pig meningitis[J]. J Exp Med, 1977, 145: 490-499.
- [4] Sihvonen L, KurI D N, Henrichsen J. Streptococcus suis isolated from the pigs in Finland[J]. Acta Vet, 1988, 29: 9-13.
- [5] Zanen H C, Engel H W B. Group R streptococci (Streptococcus suis, type 2) causing meningitis in man in The Netherlands[M]. In M. T. Parker (ed.), Pathogenic streptococci. Redbooks, Chertsey, Surrey, England. 1979. 232-233.
- [6] J Hommez, Devriese L A J, Henrichses F, et al. Identification and Characterization of streptococcus suis [J]. Veterinary Microbiology, 1986, 11(4): 349-355.

- [7] Mizanu kebede, Chengappa M M, James G. Stuart Isolation and Characterization of temperature-sensitive mutants of streptococcus suis: Efficacy trial of the Mutat Vaccine in mice[J]. Veterinary Microbiology, 1990, 22 (2~3): 249-257.
- [8] Barbara E 等主编, 赵德明等主译, 猪病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008. 877-894.
- [9] Berthelot-Herault F, Morvan H, Keribin A M, et al. Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and hemolysin by field isolates of Streptococcus suis capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France[J]. Vet Res, 2000, 31 (5): 473-479.
- [10] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries [J]. Vet Microbiol, 2000, 74: 237-48.
- [11] 姜天童, 徐涤平, 方雨玲. 猪源致病性链球菌分群鉴定及血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 1999. 25(11): 8-10.
- [12] Kurl D N, Haataja S, Finne J. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in Streptococcus suis[J]. Infect Immun, 1989, 57 (2): 384-389.

(上接第 28 页)

RT-LAMP 扩增反应来检测其 LAMP 引物的特异性。扩增结果表明除 CSFV 出现明亮的绿色荧光, 其它三个均未出现, 表明我们所设计的 LAMP 引物是具有高特异性的。RT-LAMP 扩增产物特异性酶切结果与我们所预期的相符, 也表明 RT-LAMP 方法扩增 CSFV RNA 时的高度特异性。

当然, 这种方法最吸引人的特征就是结果可视化。在 LAMP 反应后加入 SYBR Green I 染料, 得到绿色的阳性产物和橙色阴性产物, 直接读取结果, 从而大大加速了这种方法在检测中的应用。

因此, 我们建立的可视化 RT-LAMP 检测方法同常规 RT-PCR 相比, 具有高度的优越性: 快速、简单、容易操作、特异、敏感和结果可视化。这种可视化 RT-LAMP, 为猪瘟早期检测、临床诊断、防控净化提供了一种新的手段, 对于临床检测 CSF 具有现实意义。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 662.
- [2] Stegeman A, Elbers A, de Smit H, et al. The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands[J]. Vet Microbiol, 2000, 73 (2-3): 183-196.
- [3] Yoshihiro Sakoda, Osamu Yamaguchi, Akio Fukushima. A new assay for classical swine fever virus based on cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3 [J]. Journal of Virological Methods, 1998, 70 (1): 93-101.
- [4] 朱良全, 彭隽, 刘明荣, 等. 猪瘟诊断方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32 (12), 55-59.
- [5] 邵振华, 田海燕. 多价荧光抗体监测外源病毒污染的研究[J]. 中国兽药杂志, 1997, 31 (2): 1-6.
- [6] Clavijo A, Zhou E M, V ydelingum S, et al. Development and evaluation of a novel antigen capture assay for the detection of classical swine fever virus antigens[J]. Vet Microbiol, 1998, 60 (2-4): 155-168.
- [7] KOMANIWA H, FUKUSHO A, SHIMIZU, Y et al. Micro method for performing titration and neutralization test of hog cholera virus using established porcine kidney cell strain[J]. Natl Inst Anim Health Q, 1981, 21 (4): 153-158.
- [8] Semenikhin V I, Puzyrev A T, Oreshkova S F, et al. Detection of the hog cholera virus using the polymerase chain reaction[J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 1999, (1): 27-30.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28 (12): E63.
- [10] 周广青, 常惠芸, 邵建军. 环介导等温基因扩增技术及其在病毒检测中的应用[J]. 生物技术通讯, 2008, 19 (2): 290-292.
- [11] Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra S E, et al. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) bow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Arch Virol, 2005, 150 (5): 899-909.
- [12] Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of Yersinia ruckeri the causative agent of enteric red mouth disease in fish[J]. BMC Vet Res, 2008, 4: 31.
- [13] Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of campylobacter fetus[J]. Vet Microbiol, 2009, 136 (3-4): 393-396.

不同检测抗原对 H₅ 亚型禽流感抗体检测结果的影响

卢受昇, 孔令辰, 罗晶璐, 张翰

(广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

中图分类号: S854

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0033-03

禽流感(Avian Influenza, AI)是由 A 型流感病毒引起的禽类的一种急性高度致死性的传染病,尤其是高致病性禽流感(HPAI),严重威胁着养禽业的生产。实行强制免疫是我国防控 H₅ 亚型禽流感的一项重要措施,血凝抑制试验(HI)检测禽流感抗体是对免疫效果进行评价的主要手段。随着 H₅ 亚型禽流感疫苗种毒株的不断更新,检测抗原也发生了变化。为了解当前使用的各种抗原对检测结果的影响程度,我们应用 Re-1、Re-4 和 Re-5 三种抗原分别对 Re-1 和 Re-5 疫苗免疫禽血清进行检测。通过对结果比较分析,发现现用的三种抗原间存在较大的差异,且不成规律性,说明无法用一种抗原的检测结果来推测或评估另一种抗原的检测结果。提示需按照当前国家相关政策,选择与疫苗毒株同型的抗原进行检测,将有利于对各实验室间检测结果的比较。

1 材料和方法

1.1 材料 H₅ 亚型禽流感 HI 标准抗原 Re-1、Re-4 和 Re-5 以及相应的标准阳性血清均购于国家禽流感参考实验室;禽流感油乳剂灭活苗(H₅N₁, Re-1 株)免疫血清(鸡:27 份,鸭 20 份,鹅 20 份),禽流感油乳剂灭活苗(H₅N₁, Re-5 株)免疫血清(鸡:29 份,鸭 30 份,鹅 29 份),均从本所监测样品中抽取。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 按照国标《高致病性禽流感诊断技术》(GB/T 18936-2003),第三部分血凝和血凝抑制试验(HA-HI)进行。应用 Re-1、Re-4 和 Re-5 三种 H₅ 亚型禽流感 HI 抗原,分别对 Re-1、Re-5 疫苗免疫的禽血清进行检测。三种抗原的检测在同一时间、同等条件下进行。

1.2.2 数据处理 平均滴度以几何平均值±标准

偏差表示。

2 结果与分析

2.1 Re-1 疫苗免疫血清的检测结果

2.1.1 鸡血清 27 份鸡血清,Re-1 抗原的检测结果显示免疫抗体水平介于(2~11)Log₂ 范围内,平均为(7.85±2.25)Log₂; Re-4 抗原检测结果显示免疫抗体水平介于(0~6)Log₂ 范围内,平均为(1.3±1.73)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示免疫抗体水平介于(0~9)Log₂ 范围内,平均为(4.0±3.17)Log₂。Re-1 抗原检测结果水平最高,Re-1 较 Re-5 检测结果高出(1~7)Log₂,平均为(3.85±1.63)Log₂; Re-1 较 Re-4 抗原检测结果差异更大,高出值介于(5~11)Log₂,平均每份高出(6.55±2.06)Log₂; Re-5 较 Re-4 抗原检测结果也存在一定的差异,高出值介于(-1~8)Log₂,平均每份高出(2.7±2.45)Log₂。总体趋势表现为 Re-1 抗原检测结果水平最高,每一份血清的检测值均高于另外两种抗原的检测值,Re-5 次之,Re-4 较低。三者间不存在平行关系。以 Re-1 抗原检测的结果为基准,从高到低进行排序,结果见图 1。

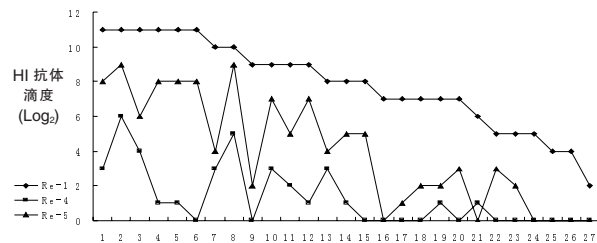


图 1 不同 HI 抗原对 Re-1 疫苗免疫鸡血清的检测结果

2.1.2 鸭血清 20 份鸭血清,Re-1 抗原的检测结果显示免疫抗体水平介于(7~11)Log₂ 范围内,平均为(7.3±1.42)Log₂; Re-4 抗原检测结果显

示免疫抗体水平介于 (0~7)Log₂ 范围内, 平均为 (0.9±2.22)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示免疫抗体水平介于 (0~10)Log₂ 范围内, 平均为 (3.35±2.92)Log₂。Re-1 抗原检测结果水平最高, Re-1 较 Re-5 检测结果高出 (1~9)Log₂, 平均为 (3.95±2.52)Log₂; Re-1 较 Re-4 抗原检测结果差异更大, 高出值介于 (2~9)Log₂, 平均每份高出 (6.4±1.73)Log₂; Re-5 较 Re-4 抗原检测结果也存在一定的差异, 高出值介于 (0~6)Log₂, 平均每份高出 (2.45±2.39)Log₂。总体趋势表现为 Re-1 抗原检测结果水平最高, 每一份血清的检测值均高于另外两种抗原的检测值, Re-5 次之, 其每一份血清的检测值均等于或高于 Re-4, Re-4 检测结果很低, 大部份检测不到抗体。三者间不存在平行关系。以 Re-1 抗原检测的结果为基准, 从高到低进行排序, 结果见图 2。

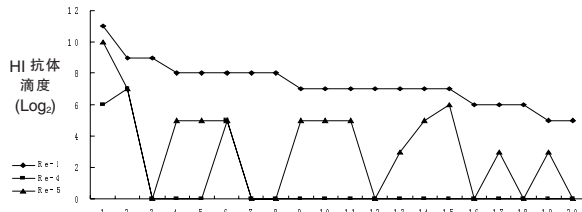


图 2 不同抗原对 Re-1 疫苗免疫鸭血清的检测结果

2.1.3 鹅血清 20 份鹅血清, Re-1 抗原的检测结果显示免疫抗体水平介于 (5~10)Log₂ 范围内, 平均为 (7.05±1.22)Log₂; Re-4 抗原检测结果显示免疫抗体水平介于 (0~7)Log₂ 范围内, 平均为 (0.9±1.84)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示免疫抗体水平介于 (0~10)Log₂ 范围内, 平均为 (1.47±2.12)Log₂。Re-1 抗原检测结果水平最高, Re-1 较 Re-5 检测结果高出 (1~10)Log₂, 平均为 (5.58±1.98)Log₂; Re-1 较 Re-4 抗原检测结果差异更大, 高出值介于 (2~10)Log₂, 平均每份高出 (6.0±2.16)Log₂; Re-5 较 Re-4 抗原检测结果也存在一定的差异, 高出值介于 (-2~5)Log₂, 平均每份高出 (0.42±1.50)Log₂。总体趋势表现为 Re-1 抗原检测结果水平最高, 每一份血清的检测值均高于另外两种抗原的检测值, Re-5 次之, Re-4 检测结果很低, 大部分样品检测不到抗体。三者间不存在平行关系。以 Re-1 抗原检测的结果为基准, 从高到低进行排序, 结果见图 3。

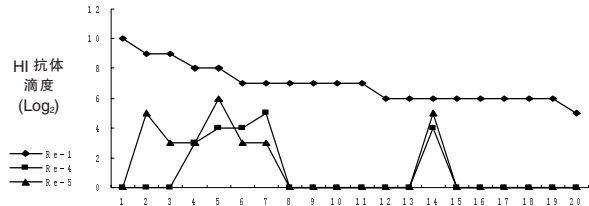


图 3 不同抗原对 Re-1 疫苗免疫鹅血清的检测结果

2.2 Re-5 疫苗免疫血清的检测结果

2.2.1 鸡血清 29 份, Re-1 抗原的检测结果显示抗体水平介于 (2~10)Log₂ 范围内, 平均为 (7.76±1.77)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示抗体水平介于 (2~9)Log₂ 范围内, 平均滴度 (6.76±1.62)Log₂; Re-4 抗原检测结果显示抗体水平介于 (1~7)Log₂ 范围内, 平均滴度 (4.14±1.90)Log₂。其中 Re-1 抗原检测结果水平最高, 较 Re-5 检测结果高出 (-1~3)Log₂, 平均高出 (1.0±0.96)Log₂; Re-1 较 Re-4 抗原检测结果差异稍大, 高出 (1~7)Log₂, 平均高出 (3.62±1.59)Log₂。Re-5 较 Re-4 抗原检测结果差异稍小, 高出 (0~6)Log₂, 平均高出 (2.62±1.63)Log₂。以 Re-5 抗原检测的结果为基准, 从高到低进行排序, 结果见图 4。

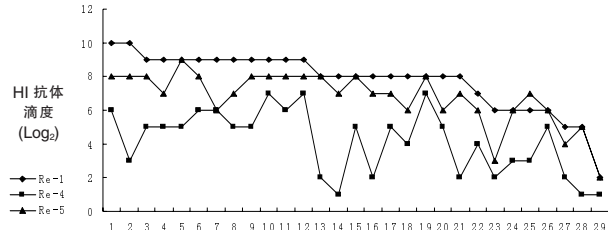


图 4 不同抗原对 Re-5 疫苗免疫鸡血清的检测结果

2.2.2 鸭血清 30 份, Re-1 抗原的检测结果显示抗体水平介于 (0~9)Log₂ 范围内, 平均为 (3.17±2.60)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示抗体水平介于 (0~10)Log₂ 范围内, 平均滴度 (3.90±2.80)Log₂; Re-4 抗原检测结果显示抗体水平介于 (1~6)Log₂ 范围内, 平均滴度 (0.77±1.63)Log₂。其中 Re-5 抗原检测结果水平最高, 较 Re-1 检测结果高出 (-3~5)Log₂, 平均高出 (0.73±1.84)Log₂; Re-5 较 Re-4 抗原检测结果差异稍大, 高出 (-1~7)Log₂, 平均高出 (3.13±2.19)Log₂。以 Re-5 抗原检测的结果为基准, 从高到低进行排序, 结果见图 5。

2.2.3 鹅血清 29 份, Re-1 抗原的检测结果显示抗体水平介于 (5~11)Log₂ 范围内, 平均为

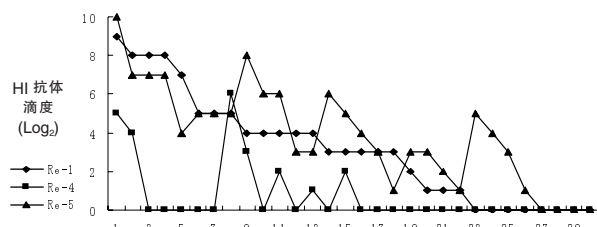


图5 不同抗原对 Re-5 疫苗免疫鸭血清的检测结果

(8.39 ± 1.44)Log₂; Re-5 抗原检测结果显示抗体水平介于 (3~11)Log₂ 范围内, 平均滴度 (6.52 ± 1.68)Log₂; Re-4 抗原检测结果显示抗体水平介于 (2~7)Log₂ 范围内, 平均滴度 (3.93 ± 1.19)Log₂。其中 Re-1 抗原检测结果水平最高, 较 Re-5 检测结果高出 (0~6)Log₂, 平均高出 (2.41 ± 1.18)Log₂; Re-5 较 Re-4 抗原检测结果差异较大, 高出 (1~5)Log₂, 平均高出 (2.59 ± 1.05)Log₂, Re-1 较 Re-4 抗原检测结果差异更大, 高出 (3~7)Log₂, 平均高出 (5.0 ± 1.22)Log₂。三者整体趋势相对较一致。以 Re-5 抗原检测的结果为基准, 从高到低进行排序, 结果见图 6。

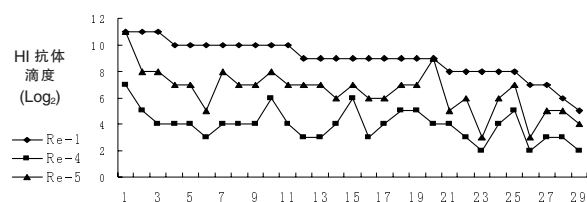


图6 不同抗原对 Re-5 疫苗免疫鹅血清的检测结果

3 小结与讨论

3.1 当前使用的三种抗原间存在较大的差异, 在检测水禽血清时尤为突出。在检测 Re-1 株疫苗免疫血清时, Re-1 抗原的检测值无论是鸡、鸭还是鹅的血清抗体滴度均为最高。在检测 Re-5 株疫苗免疫鸡血清时, Re-1 抗原的检测值仍为最高, 但在检测鸭血清时低于 Re-5 抗原检测值。

3.2 根据 WHO^[1]对 H₅N₁ 亚型禽流感病毒 HA 基因的亲缘关系的划分, Re-1 株抗原 (A/goose/Guangdong/96) 处于分枝 0 (clades 0); Re-4 株抗原 (Ck/shanxi/2/06) 处于分枝 7 (clades 7); Re-5 株抗原 (Anhui/1/05) 与当前多数流行株同处于分枝 2.3.4 (clades 2.3.4), 三者间亲缘关系上存在较大的差距, 这是引起抗原性差异的分子基础。作为 HI 抗原, 不同毒株间的抗原相关性可能存在比

较复杂的情况, 其抗原性可分为几种类型, 第一种可能是“广谱”型, 即检测同亚型及其他毒株的抗体均高; 第二种是“一般型”, 即检测同亚型的免疫抗体高, 其他亚型则低, 或是检测其他亚型高, 检测同亚型低; 第三种是“窄谱”型, 即检测任何亚型均低。

本试验中 Re-1 株抗原表现出很好的“抗原广谱”性, 可能属于第一类型。Re-5 株抗原可能属于第二种类型, Re-4 株抗原因该试验没有检测 Re-4 免疫血清, 不能确定其具体属于哪一种类型。

3.3 Ducatez 等^[2]对非洲 H₅ 亚型禽流感病毒的进化研究数据显示: HongKong/156/97 (与 Re-1 株抗原同处于 clades 0) 能与全球不同地区的 7 株病毒的免疫抗体发生很好地反应, 而属于其他分支的毒株只能与部分毒株的免疫抗体反应, 而 Vietnam/1203/04 株 (处于 clades 1) 却只与少数病毒有低滴度的反应。结合本试验结果我们推测处于分支 0 的毒株的可能具有“抗原广谱性”, 其原因可能是以 A/goose/Guangdong/96 (Re-1 株抗原) 为代表的处于分枝 0 的毒株, 作为致病性 H₅ 亚型禽流感的“始祖”, 其 HA 中的抗原位点是完整的。随着时间的推移, 在自然或免疫压力下, 有些抗原位点朝不同的方向发生了变异, 形成当前 1-9 的不同分枝的病毒, 从而导致这些毒株相互间的抗原性差异较他们与“始祖”间的差距大, 表现为相互间的抗原谱变窄。

3.4 本试验表明三种抗原检测的结果间存在较大的差异, 且不成规律性, 无法用一种抗原的检测结果来推测或评估另一种抗原的检测结果, 所以在进行免疫抗体监测时, 统一按照当前国家相关政策, 选择与疫苗毒株同型的抗原进行检测, 将有利于对各试验室间检测结果的比较。

参考文献:

- [1] WHO-EID-nomenclature-system. World Health Organization (WHO). Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H₅N₁). <http://www.cdc.gov/EID/content/14/7/e1.htm>.
- [2] Ducatez M F, Olinger C M, Owoade A A, et al. Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa[J]. Journal of General Virology, 2007, (88): 2297-2306.

利用 H₉ 亚型的 HA1 蛋白建立 ELISA 抗体检测方法

凌传华, 罗英娇, 黄柳明, 范瑞环
(梅县动物卫生监督所, 广东 梅州 514700)

摘要: 利用表达的禽流感病毒 H₉ 亚型的 HA1 蛋白, 经金属螯合填料纯化, 作为包被抗原, 建立了一种检测血清中 H₉ 亚型禽流感抗体的间接 ELISA 方法。用本试剂盒检测大肠杆菌的 O₁、O₂、O₇₈ 株单因子血清, H₅、H₇ 禽流感、新城疫、传染性法氏囊病阳性血清, OD₆₅₅ 值均小于 0.109, 为阴性, 结果表明所建立的 ELISA 方法具有良好的特异性。

关键词: H₉ 亚型禽流感; 抗体; ELISA; 试剂盒
中图分类号: S854 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0036-04

H₉ 亚型流感病毒(AIV)分布广泛,它可以与其他致病微生物协同作用造成鸡群生长缓慢,产蛋率下降,给养禽业带来巨大的经济损失。更为严峻的是目前已有 H₉N₂ 亚型 AIV 感染人的报道,因此对 H₉ 亚型禽流感的研究和防制具有重要的公共卫生意义^[1]。血凝及血凝抑制试验最为常用,是目前世界公认的检测 AIV 抗体的方法。但是这种方法存在着一些缺点,如红细胞的保存时间短,受外界客观因素的影响较多,试验人员在判断标准上有个体差异等。而 ELISA 则具有敏感性高,特异性好、重复性强、稳定性好的特点,其试验结果用酶标读数仪读数,避免了因操作者个体读数的差异,使读数更科学,试验更自动化。

1 材料

1.1 诱导表达及纯化重组 HA 蛋白的相关试剂和 SDS-PAGE 溶液相关材料 参考文献^[2]进行配置。大肠杆菌 DH5a、大肠杆菌 BL21(DE3)均购自青岛正大动物保健中心实验室。

1.2 ELISA 试剂和溶液

1.2.1 0.01M pH7.4PBS NaCl 80.00g、KCl 2.00g、Na₂HPO₄ 11.40g、KH₂PO₄ 2.40g,加去离子水溶解并定容至 10 L。

1.2.2 0.01M pH7.4PBST 在上述 PBS 中按 0.5%加入吐温-20,混匀。

1.2.3 包被液 NaHCO₃ 2.93g、Na₂CO₃ 1.59g、MgCl₂ 0.203g,加 ddH₂O 至 1 000 mL,调至 pH9.6。

1.2.4 封闭液 脱脂奶粉 25 g、吐温-20 1mL、NaN₃ 0.02%(终浓度)、用 pH 7.4 0.01M 的 PBS 溶

解,定容至 500 mL。

1.2.5 血清稀释液 1%BSA 的 PBST,其中含有 0.2%NaN₃。

1.2.6 洗涤液 PBST

1.2.7 酶标二抗稀释液 含有 10%马血清的 0.01M pH7.4 的 PBST

1.2.8 其他材料 酶标二抗、底物及阳性血清购自青岛正大动物保健中心。

1.3 主要仪器设备及耗材 高速离心机,电泳成套设备,超纯水仪,纯化填料,酶联仪,酶联洗板机,进口可拆酶标板,超净工作台,高速离心机,超速离心机,电子天平。

2 方法

2.1 HA 蛋白的诱导表达

2.1.1 挑选生长良好、阳性质粒转入成功的大肠杆菌 BL21(DE3)单个菌落接种于 3 mL LB(含 30 μg/mL Kana)培养基中,37℃过夜培养。

2.1.2 取 2 mL 饱和菌加入 200 mL 培养液中,37℃振荡中扩大培养 2~3 h,取 200 μL IPTG 加到上述饱和菌中,30℃振荡 10 h。

2.1.3 取 1 mL 诱导完成的菌液至 2 mL 离心管中,12 000 rpm 离心 3 min,弃上清液,将沉淀重悬,再加入 80 μL 上样 Buffer,混匀,沸水浴 3 min。

2.1.4 SDS-PAGE 电泳进行分析。

2.2 诱导表达菌的超声裂解 取 200 mL 细菌培养物,12 000 rpm,离心 5 min,弃上清液;用 10 mL NTA-0 buffer 重悬沉淀;加入一定量的 PMSF 至终浓度为 1 mM。加入一定量的溶菌酶(终浓度

为 0.2 mg/mL); 混匀, 冰上放置 30 min; 超声波裂解菌体; 加入 10% Triton X-100 (终浓度为 0.05%), 充分混匀, 冰上放置 15 min, 冰浴超声破碎细胞; 加入 1M MgCl₂ 至终浓度为 1 mM, 混匀; 加 DNase 使终浓度为 10 μL/mL, 混匀; 室温放置 10 min; 12 000 rpm, 4℃ 离心 20 min; 分别取 1 mL 上清和 1 mL 细菌培养物的沉淀。分别加入 100 μL SDS 上样缓冲液, 混匀, 煮沸 5 min。取 15 μL 样品做 SDS-PAGE。

2.3 HA 蛋白的纯化 以表达 HA1 蛋白的重组工程菌的裂解上清为材料, 参照上海申能博彩生物科技有限公司的“BBST NTA Resin 使用方法”, 对表达的蛋白进行纯化。(1) 将 1 mL NTA 树脂装入层析柱, 静置; (2) 用 10 mL NTA-0 buffer 平衡层析柱; (3) 取 4 mL 菌体裂解上清加到 NTA 层析柱中, 流速控制在 15 mL/h, 收集穿透部分, 标记为“穿透液”。(4) 用 5 mL NTA 体积的 NTA-0 buffer 洗脱, 流速控制在 30 mL/h。(5) 依次用 5 mL NTA-20、NTA-40、NTA-60、NTA-80、NTA-100、NTA-200、NTA-1000 buffer 洗脱, 流速控制在 15 mL/h 左右。收集洗脱液, 每管收集 1 mL。(6) 将收集的样品, 进行 SDS-PAGE 分析, 确定目的蛋白在洗脱液中的分布情况。

2.4 ELISA 方法的建立

2.4.1 反应板均一性测定 从不同酶标板中随机取出 6 条酶标反应条, 用 400 倍稀释的酶标抗体直接包被酶标板, 做 ELISA 反应, 测定 OD 值, 计算各孔间的标准差, 测定不同酶标板的均匀度。

2.4.2 重组 HA 蛋白抗原最适包被浓度和阴阳性血清的最佳稀释度以及酶浓度的确定 阴阳性血清分别做 20、50、100 倍稀释, 与稀释 200、400、800 倍的包被抗原以及稀释 800、1000、1200 倍的酶标二抗做方阵实验。每组为 40 份免疫鸡血清, 30 份非免疫鸡血清和 10 份 SPF 鸡血清, 共 27 组。并得到每组样品的 OD 值。

2.4.3 确定阴阳性临界值 根据公式: 阴阳性临界值 = SPF 样本 OD 平均值 + 3 × 标准偏差, 算出每组阴阳性临界值。用阴阳性临界值来衡量阳性血清和非免疫鸡血清, 计算出每组的敏感性(阳性符合率)和特异性(阴性符合率)。敏感性最高和特异性最高的一组即为阴阳性临界值。

2.5 间接 ELISA 方法的特异性实验 对大肠杆

菌的 O₁、O₂、O₇₈ 株单因子鸡血清, H₅、H₇ 禽流感、新城疫、传染性法氏囊病阳性鸡血清, SPF 鸡血清用已经建立的 ELISA 方法进行检测。

2.6 与传统的血清学方法(HI)对免疫鸡血清抗体检测的符合率比较

2.6.1 从某动物保健中心购买 280 份鸡血清样品(共 14 组, 每组 20 份); 14 组鸡血清为 1 d 到 56 w 不同周龄段的鸡血清, 免疫组都均于 4 w 首免, 12~13 w 二免, 22 w 三免, 40 w 四免。将检测得出各日龄鸡血清 H₉ 亚型 HI 效价和 OD_{655/490} 读数结果整理后求出了各日龄的平均值, 并绘制了日龄-OD 值、日龄-HI 效价曲线。

2.6.2 由石家庄华牧牧业有限责任公司提供 12 组鸡血清, 分别为 1 d 到 62 w 不同周龄段的鸡血清。该鸡场免疫程序为 14 d 首免, 40 d 二免, 120 d 三免, 300 d 四免。检测各日龄鸡血清 H₉ 亚型 HI 效价和 OD_{655/490} 读数结果整理后求出了各日龄的平均值, 并绘制了日龄-OD 值、日龄-HI 效价曲线。

3 结果与分析

3.1 HA 蛋白的诱导表达 5%SDS-PAGE 电泳, 与空载体菌阴性对照相比, 可见表达蛋白分子量约 41 KD, 与理论值相符。非经 IPTG 诱导的重组菌未出现多余条带(图 1)。

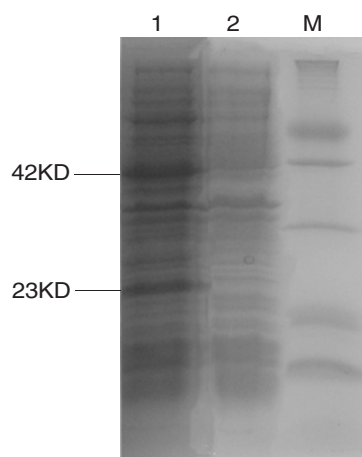


图 1 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果
1: 表达菌; 2: 阴性对照菌; M: 标准分子量

3.2 ELISA 方法的建立

3.3 反应板均一性测定 各孔平均 OD 值为 0.534, 变异系数为 2.8%, 小于 10%, 说明这种酶标板各孔的均一性良好, 能够满足 ELISA 实验的要求。

3.4 重组 HA 蛋白抗原、酶标二抗浓度、血清的最佳稀释度以及阴阳性临界值的确定 在稀释 200 倍的包被抗原、1 000 倍的酶标二抗、50 倍的稀释血清的条件下, 敏感性(阳性符合率)最高(100%), 特异性(阴性符合率)也最高(96.67%), 确定为本试剂盒的最佳工作条件。将该组的阴阳性

临界值 0.109 定为本方法的临界值(见表 1)。

3.5 间接 ELISA 方法的特异性实验 大肠杆菌 O₁、O₂、O₇₈, SPF, H₅, H₇, ND, IBD 等病原体单特异性阳性血清的 OD₆₅₅ 值均小于 0.109, 为阴性。说明它们与纯化的 HA1 蛋白抗原没有交叉反应, 具有良好的特异性。

表 1 重组 HA 蛋白抗原、酶标二抗浓度、血清的最佳稀释度的优化结果

项目	200/800/20	200/800/50	200/800/100	200/1000/20	200/1000/50	200/1000/100	200/1200/20	200/1200/50	200/1200/100
阴阳临界值	0.237	0.212	0.108	0.238	0.109	0.065	0.175	0.104	0.063
敏感性	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
特异性	10%	3.33%	3.33%	60%	96.67%	20%	33.33%	76.67%	36.67%
项目	400/800/20	400/800/50	400/800/100	400/1000/20	400/1000/50	400/1000/100	400/1200/20	400/1200/50	400/1200/100
阴阳临界值	0.234	0.136	0.103	0.163	0.081	0.064	0.147	0.086	0.068
敏感性	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
特异性	46.67%	0%	6.67%	10%	30%	13.33%	23.33%	30%	47.67%
项目	800/800/20	800/800/50	800/800/100	800/1000/20	800/1000/50	800/1000/100	800/1200/20	800/1200/50	800/1200/100
阴阳临界值	0.212	0.129	0.088	0.179	0.076	0.055	0.133	0.07	0.059
敏感性	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
特异性	40%	76.67%	80%	86.67%	70%	56.67%	46.67%	30%	86.67%

3.6 与传统的血清学方法(HI)对免疫鸡血清抗体检测的符合率比较

3.6.1 从保健中心血清的血凝抑制试验得出的 HI 效价可看出, 在首免后, 抗体有明显的升高。在二免、三免、四免后都会出现一个免疫高峰。检测结果很好地解释了抗体动态变化规律, 与理论上的变化相符合(见图 2)。

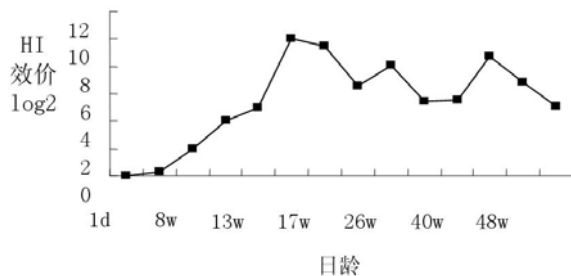


图 2 HI-日龄曲线图

用 ELISA 方法得出的 OD 值总体上偏低, 均小于 0.4。这使在试验中很小的波动就会产生很大的误差。在 4W 龄首免以后, 二免有升高趋势, 趋势明显; 三免, 四免后测得的 ELISA 结果(OD 值)都有升高的趋势, 但趋势不是很明显。可能的原因是因为 H₉ 蛋白的包被浓度过低, 或由于试验中酶的影响(见图 3)。

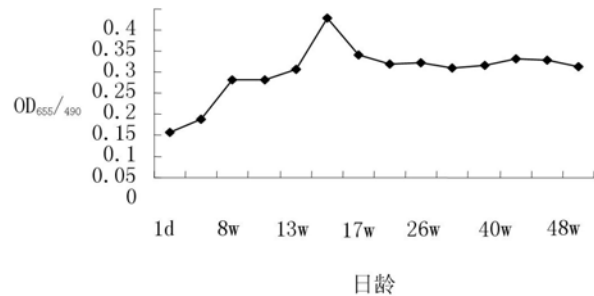


图 3 OD-日龄曲线图

3.6.2 从华牧公司血清的检测结果来看, 这批鸡的母源抗体较高(OD₆₅₅=0.508)。经过首次免疫, 抗体水平略有增加, 但过后就一直下降, ELISA 效价在 4 w 龄达到最低(OD₆₅₅=0.192), 这是因为母源抗体被逐渐消耗, 而一免产生的抗体又没有达到较高的水平, 随着免疫次数的增加, 抗体水平随后逐渐升高。在 26 w 出现一高峰。从 HI 效价曲线上也能得出类似的结果。从这次实验的结果可以看出 ELISA 所测的 OD 值与 HI 效价存在相关性(见图 4、图 5)。

4 讨论

4.1 用 ELISA 方法得出的 OD 值总体上偏低, 均小于 0.7。这使得在试验中很小的波动就会使实

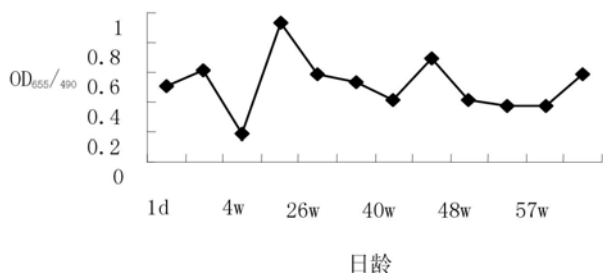


图 4 OD-日龄曲线图

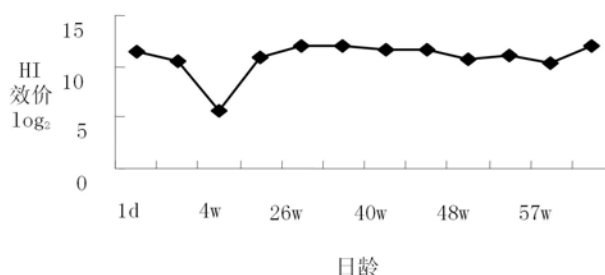


图 5 HI-日龄曲线图

验产生很大的误差。可能原因是 H₉ 蛋白在变性的情况下纯化,最后复性的效果不是很好,使其结合抗体的能力下降。

4.2 根据我们所做的血抑实验发现,我们纯化的 HA 蛋白免疫鸡所产生的抗体不具有血抑性,提示 ELISA 所检测的抗体与血凝抑制抗体不是同一抗体。可能是由于纯化蛋白时采取变性提取,即以包涵体的形式提取蛋白,与其在自然状态中的分子构象是不同的。但它们都是机体对同一蛋白的不同表位产生的,所以它们在体内的浓度理论上应

该成正相关,这与实验结果大致是相同的。但在实际操作中,由于存在包括手工误差,个体差异等多方面因素,所以个别样品的 HI 效价与 OD 值之间会有差异。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1995. 3-5.
- [2] 汪家政, 范明. 蛋白质手册[M]. 北京:科学出版社, 2000. 108-114, 211-215.

全国春季重大动物疫病防控工作进展顺利

今年以来,农业部组织各地畜牧兽医部门严格落实中央确定的 24 字防控方针,紧紧围绕“两个千方百计、两个努力确保”的中心任务,采取有效措施,集中力量,扎实推进春季集中免疫工作,夯实重大动物疫病防控工作基础,重大动物疫病防控工作成效显著,全国重大动物疫情保持平稳。

按照国家动物疫病强制免疫计划,今年春季集中免疫工作 3 月初已全面推开。目前,牲畜口蹄疫、高致病性禽流感、高致病性猪蓝耳病、猪瘟、新城疫免疫进度均已超过 50%。预计 5 月上旬大部分地区将提前完成集中免疫工作。在突出做好春季集中免疫工作的同时,农业部和各地兽医部门继续采取综合性防控措施,保质保量地做好春季重大动物疫病防控工作。一是抓好疫情监测报告。根据国家动物疫病监测计划的要求,抓好疫情监测和流行病学调查工作。重点强化种畜禽场、交易市场、养殖密集区、候鸟栖息地等重点地区的疫情监测工作,及时掌握疫情动态。严格执行疫情报告和疫情举报核查制度,及时上报疫情。二是抓好检疫监督。加强对动物及动物产品的屠宰、经营、运输、储藏等环节的监督检查。进一步强化产地检疫和屠宰检疫,加大公路动物卫生监督检查站执法力度,认真查验验物,防止疫病跨区域传播。三是抓好应急准备。按照《重大动物疫情应急条例》和《国家突发重大动物疫情应急预案》要求,进一步强化应急防控工作机制,加强应急预备队建设和应急物资储备,不断增强应急处置能力。加强应急值守,做好应对突发疫情的各项准备。四是抓好边境地区防控。农业部与海关、质检等有关部门密切配合,强化联防联控,完善边境防控长效机制。边境省区进一步加强边境地区巡查和疫情监测,创新边境防控机制,严防死守,防止境外疫情传入。

今年周边国家动物疫情频发,病毒不断变异,防控形势严峻,农业部特别加大了禽流感等重点病种防控力度。禽流感防控,重点抓好活禽交易市场监管和水禽免疫工作。A 型口蹄疫防控,重点抓好调运检疫监管和奶牛、种公牛免疫工作。严格奶牛种牛暂停调运措施,严厉查处违规调运行行为,防止流通环节传播疫情。高致病性猪蓝耳病防控,重点做好活疫苗免疫和养殖场户综合防疫管理,指导养猪大省加强养殖场防疫管理,规范养殖行为,提高生物安全水平。布病防控,按照因地制宜分类指导的原则,强化免疫、监测和扑杀等各项措施。农业部将在内蒙古、吉林等省份开展区域化综合防控试点工作,力争尽快遏制局部地区疫情上升势头。甲型 H1N1 流感防控,继续加强生猪甲型 H1N1 流感监测和流行病学调查工作,落实各项防控措施,有效保障人民群众身体健康和动物产品消费安全。(来源:农业部网站)

小型犬难产

陈海南, 黄群山*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 随着国民经济的不断发展, 人们生活水平的提高, 城市禁养大型犬的呼声提高, 家庭结构的小型化, 饲养小型犬的人越来越多。由于小型犬具有体格小, 产道狭窄, 胎儿较多、有的胎儿较大等特点, 导致发生难产机会增大。以下就难产发生的病因、症状、诊断、治疗和预防作一简单介绍。

关键词: 难产; 犬

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0040-03

难产是指母体在分娩过程中不能将胎儿顺利娩出体外的一种常见产科疾病。目前的研究已经证实, 小型犬和微型犬的难产危险指数较高^[1]。小型犬的妊娠期一般在 58~65 d 左右。若超期仍未分娩或分娩过程中母犬表现出食欲不振、精神沉郁、焦虑烦躁、伴有疼痛的哀叫、引颈垂头护腹、后肢附有粘液及墨绿色分泌物、常躲缩在阴暗角落等一系列现象, 即可怀疑发生难产^[2]。如果助产不当, 可造成母子生命垂危、生殖器官受损或其它产科疾病。

1 病因

难产可由母体因素或胎儿因素引起, 在一些病例中, 由这两者共同引起^[3]。

1.1 胎儿性难产 妊娠期营养过剩, 胎儿数量少, 怀孕期长, 胎儿畸形和水肿, 大型公犬与小型母犬交配等都可造成胎儿过大导致难产。胎儿位置不当, 如竖向、横向、背位、臀位、侧位; 胎势异常, 如头颈侧弯、头向后仰、头颈捻转、碗部前置、肩部前置、肘部前置、坐骨前置、肩关节屈曲、肘关节屈曲、颈部屈曲等都可造成难产。激素(如胎儿垂体激素及肾上腺皮质激素)分泌不足, 导致分娩异常也可造成难产。

1.2 母体性难产 胎儿过大、胎儿过多和胎水过多, 导致子宫过度扩张; 胎衣早破, 胎水流失, 产道干涩, 造成胎儿滞留产道; 子宫内膜炎引起子宫肌纤维变性, 子宫切开引起子宫肌增生变厚; 运动不足, 缺乏光照, 过度肥胖; 各种激素(孕酮、雌激素、

前列腺素或垂体后叶素)分泌失调; 钙、葡萄糖不足等都可使宫缩乏力, 从而导致难产。腹壁有疝痛, 膈肌损伤等可造成母犬阵缩疼痛或阵缩无力而发生难产。营养不足导致骨盆发育不全; 妊娠过早, 个体发育未成熟、骨盆窄小或耻骨不开; 骨盆有骨折病史, 骨盆内血肿, 骨盆有骨瘤, 骨盆部的软骨肉瘤, 骨盆部淋巴结的淋巴瘤, 骨盆发育畸形等导致胎儿不能正常进入产道, 从而发生难产。子宫颈扩张不全, 阴道扩张不全, 阴门扩张不全等导致胎儿难产出。分娩或其他原因引起产道损伤, 产道粘膜水肿, 胎膜水肿, 胎盘前置, 阴道周围脂肪过度沉积, 结肠堵塞或膀胱扩张; 子宫颈、阴道、阴门狭窄; 子宫扭转, 子宫弛缓, 子宫折叠于骨盆前缘; 子宫颈没有开放, 胎儿产出通道存在障碍, 大剂量使用催产素, 出现子宫撕裂甚至子宫破裂等都可造成难产。产前突然更换生产环境, 母犬产生恐惧亦可导致难产。

2 症状和诊断

2.1 症状 从配种的当天开始计算, 母犬妊娠天数大于 72 d; 或强烈努责持续 30 min 以上而未产出胎儿; 或努责次数少、时间短、力量弱, 2 h 以上没有分娩出胎儿; 或已到预产期, 母犬阵缩适当, 精神沉郁、烦躁不安、食欲欲减少或废绝, 常曲颈垂首护腹, 频频回头舔阴部, 体力下降, 呈频排尿姿势, 后肢附有粘液, 阴门流出墨绿色排泄物之后, 超过 4~6 h 仍不能娩出胎儿^[4]; 阴道检查发现盆腔阻塞; X 线检查胎位异

常, 胎儿未进入产道。有上述情况之一者可诊断为难产^[5]。

2.2 临床检查 询问母犬的年龄及胎次产程, 是否是初产, 是否有难产史, 配种日期, 公犬的品种与大小, 本次分娩的启动时间, 已产出的仔犬数及每个胎儿产出的间隔时间, 是否进行过助产、采用的方法、经过及结果如何, 既往繁殖史与病史等, 大致预测难产的程度。

检查母犬的体温、呼吸、脉搏、精神状态及可视粘膜等全身状况, 注意其行为, 是否能站立、努责特性和频率。观察乳腺发育, 有无充血、膨胀和乳汁。腹部触诊, 粗略地估计胎儿的数量。检查外阴和会阴部, 注意其颜色和阴道分泌物的数量。母犬外阴部洗干净并消毒, 食指消毒涂润滑油后配合努责伸入阴道内, 另外一手配合触压腹后部, 仔细检查产道的松软及润滑程度、软产道有无异常、子宫颈口是否张开、骨盆的大小、胎儿在骨盆前口所处的位置、姿势、有无先天性或后天性异常及子宫收缩对阴道壁压力的发生等情况^[6]。阴道前部紧张表明子宫肌活动良好, 相反, 表明子宫肌无力。子宫颈关闭时, 阴道液体不足, 手指插入阻力大, 阴道壁紧裹手指; 子宫颈开放时, 常有胎水流, 阴道被润滑, 阻力小。检查产道时, 还应检查产道中液体的性状如颜色、气味, 是否含有组织碎片。产道液体浑浊恶臭, 含有脱落的胎毛, 表明胎儿气肿或腐败。影像检查对估测一般性盆骨异常、胎儿数量、胎位、胎向、胎势、胎儿大小及先天性缺陷与死胎有意义。

3 治疗

临床上三种治疗方法: 药物治疗、人工助产和剖腹产。

3.1 药物治疗 已到预产期并出现分娩征兆, 但阵缩及努责次数少、时间短、力量弱, 产力不足, 胎儿久产不出, 指检子宫颈完全扩张; 生下第一只仔犬或阴道指检产道和胎位正常, 但阵缩无力者可以注射 5~10 U 催产素, 间隔 30 min, 连续注射 2~3 次^[7,8], 并用手向后帮助推压腹部。多次小剂量注射催产素优于单一的大剂量注射^[9]。使用催产素前可先静注 10% 葡萄糖酸钙注射液 10 mL 增强子宫收缩^[10]。将犬放在安静的地方, 并注意观察。如果子宫内胎儿过多, 多次注射催产素会导致

母犬体力过度消耗, 对于这种情况一般不采用药物治疗。在难产原因不明的情况下, 不可乱用催产素, 否则容易造成子宫破裂或胎儿窒息死亡^[11,12]。

3.2 人工助产 对于胎向、胎位、胎势正常, 子宫颈口全开、骨盆正常者, 可应用胎儿挤出法。一手在腹壁外配合母犬子宫收缩将胎儿推向骨盆方向, 另外一手食指牵引胎儿头部或臀部往外拉。牵拉胎儿的力量要适中, 如果一次不成功, 可以重复多次, 直至成功。

对于胎位不正造成的难产, 首先矫正胎位。母犬外阴部洗净并消毒, 将两后肢提起, 往阴道内注入石蜡油 3~5 mL, 右手消毒后一根手指插入阴道, 把胎儿推入骨盆腔, 左手在腹壁外配合往一个方向挤压推拿矫正胎位。如果子宫内还有其它胎儿, 先推回胎位不正后面的胎儿, 以便有足够的空间矫正胎位。对于胎儿过大造成的“堵塞性”难产, 扩大产道口径(阴门上方切开 2~3 cm)。胎儿接近阴门时, 扩张阴门两侧。腹壁按摩子宫, 促进子宫有规律性收缩, 并在子宫收缩时按压腹部, 增加腹压。当胎儿露出阴门时, 用手牵引胎儿, 将胎儿拉出。对于死胎和畸形胎采用碎胎术。用肥皂水灌肠减压^[13], 常规消毒外阴产道, 注入石蜡油润滑, 原则是, 胎儿的哪个部位在向外的方向, 就先拉掉这个部位。头前置者, 拉掉下颌骨、头盖骨, 减小头的体积然后拉出胎体。头颈侧弯肩前置者, 用止血钳夹住肩胛骨先拉出一臂, 再断其另一臂, 再断其颈, 拉出头。坐生时, 或一腿先出、另腿屈曲时, 先拉出其一腿, 后拉出另一腿, 再拉出胎体。胎体过大时, 将其内脏先取出, 再取出肋骨等, 缩小胎儿体积后将其拉出。

对于母体因素造成的难产。各种因素导致的产力性难产, 母体精神状态较好者, 所怀胎儿少于 3 只时, 使用催产素 5~10 U, 观察让其自然分娩; 母体精神状态较差, 体力明显不足者, 所怀胎儿 2 只以上, 补充能量和钙剂, 然后肌注或静脉滴注催产素, 促进胎儿排出。催产无效的原发性宫缩乏力或子宫弛缓者, 可将手指伸入产道扣住胎儿上颌, 另一只手通过腹壁在耻骨前缘抵住胎儿头部以侧位方式将胎儿胎头抵入骨盆入口, 胎头入骨盆后, 以上位方式, 当母犬阵缩努责时, 压迫腹壁协助胎儿排出, 若胎儿较多, 应及时进

行剖腹产。产道性难产,对于骨盆狭窄者,胎儿是活的可行剖腹产,胎儿是死的可行截胎术,截胎不行可行剖腹产;对于子宫颈不开张、子宫捻转、宫外孕、胎盘粘连等引起的难产,只能行剖腹产;对于外阴偏小引起的难产,胎儿通过有困难时,可行阴门侧切术。

3.3 剖腹产 阵缩或努责逐渐减弱,临床检查为子宫颈口不开、产道狭窄、母体过于肥胖、胎位不正、胎儿过大、疑有死亡胎儿、木乃伊胎等原因造成的难产,经药物治疗和人工助产无效时,应及时进行剖腹产手术。

3.3.1 麻醉与保定 全身麻醉为主(犬眠宝),局部浸润麻醉为辅(盐酸普鲁卡因或利多卡因),注意麻醉不宜过深。全麻前 10 min 左右肌肉注射阿托品,可减少呼吸道黏膜和唾液腺分泌,抑制胃肠蠕动,防止呕吐和吸入性肺炎。全麻药对衰弱的母犬有抑制作用,故对衰弱的母犬可仅用局部麻醉。多数犬手术切口选在脐后腹正中线上,进行仰卧保定。对于腹压较大的犬常采用左侧横卧保定(犬通常采用右侧睡卧姿势),进行左侧腹壁切口。术部常规剃毛,并用新洁尔灭溶液洗净,术部碘酊消毒后,用酒精脱碘。

3.3.2 手术术式 术部覆盖灭菌创巾,进行腹正中线上切口,前端定位在脐孔后约 1 cm,切口末端定位在倒数第一对乳房前约 2 cm,依次切开皮肤、腹肌,钝性分离腹膜。切口大小根据犬品种的大小而定,一般为 5~15 cm。如行左侧腹壁切口,则在股骨头和最后肋骨引一水平连线交点的中点往前后作一长 8~12 cm 的切口,依次切开皮肤、肌肉,暴露出腹膜,钝性分离腹膜打开腹腔^[14]。术者手伸入腹腔找到子宫角,将子宫缓慢拉出创口,用大块纱布填塞覆盖好子宫与腹壁之间的切口,注意观察,防止组织受损,及时补充生理盐水。在子宫角大弯靠近子宫体处,避开血管和胎盘作纵向切口,切口大小为 4~12 cm。用两舌钳分别固定子宫切口断端,将靠近切口的胎儿及胎衣一起拉出。迅速扯破胎膜,擦净胎儿口、鼻和面部黏液,断脐后涂擦碘酊,用干净纱布将胎儿包好放入产仔箱。用手在子宫外面将剩余胎儿逐个地向切口方向推移,按上述方法依次拉出同侧子宫角的全部胎儿。对侧子宫角的胎儿用同

样的方法取出。如对侧子宫角的胎儿取出困难,可再作一切口。胎儿全部取出后,清理残留的胎水、血液及胎衣碎片,向子宫内放入 80~160 IU 青霉素、50~100 IU 链霉素或 0.5~2.5 g 土霉素。用含有青霉素的温热生理盐水洗净子宫壁及其切口,切口两侧对齐进行连续全层缝合,再作浆膜肌层水平内翻包埋缝合。然后用温热生理盐水冲洗子宫,如腹腔被污染,清理腹腔,切口内涂布油剂青霉素,最后将子宫恢复原来位置。取出腹壁切口周围的纱布,腹腔内注入含青霉素 40~160 IU、链霉素 50~100 IU 的温热生理盐水。连续缝合腹膜,结节缝合皮肤,切口涂擦碘酊,外缝纱布绷带。

3.3.3 术后护理 对于已苏醒的犬,1 500 IU 破伤风抗毒素稀释后肌注,常规抗菌、消炎镇痛护理 3~5 d;对于未苏醒的犬,注射苏醒灵 3 号(1:1)进行催醒。对于病情严重的犬给以强心、补液;若子宫内有残留胎膜或坏死组织,为防止败血症的发生,可用催产素配合输液、抗菌、消炎进行治疗。术后减食 2 d 后可正常喂食,饮水充足,安静修养,术后一周左右可拆线。

4 预防

一般要求母犬 15~18 月龄配种(达到体成熟),在正常发情第 13 d 左右隔日配种 2 次以上(母犬阴部分泌物变淡红色,阴部稍软缩时配种)^[15]。遵循体型相近或差距小的公母犬相配,杜绝体型大的公犬配体型小的母犬,避免近亲繁殖。妊娠期禁止滥用药物,存在与产科相关疾病的犬尽量少配或不配。妊娠期给予营养丰富、易消化的食物,但不要营养过量^[16]。进行适当合理的运动,提供必要的光照,促进母体及胎儿的血液循环,增强新陈代谢,以利正常分娩^[17]。保证产区安静,产前提前进入产房,尽量不要更换饲养员,减少母犬分娩时的恐惧心理。到达预产期时,勿作剧烈运动,注意观察,一旦确定为难产,及时送往动物门诊处置。

5 结语

导致犬难产的因素很多,以母犬营养过剩、运动少,胎儿过大为主。现在小型犬的难产呈上升趋势,大部分是人为因素造成的。犬主饲养管理不

(下转第 46 页)

一例疑似淋巴瘤犬的诊疗

洪国平, 陈钦如, 黄标军, 王 乐
(深圳趣致宠物医院, 广东 深圳 518031)

中图分类号: S857.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0043-02

淋巴瘤是一种淋巴样肿瘤, 主要影响淋巴结和其他脏器如肝脏、脾脏。临床上主要出现全身性淋巴组织瘤、食欲减退、肝肾肿大、眼部异常等症状。淋巴瘤是临床上最常见的恶性肿瘤之一。如果不进行治疗, 有50%患犬会在2~4个月内死亡, 很少能存活6个月; 如果进行积极的治疗, 患犬存活一年甚至更长时间的概率将大大提高。本院2010年接诊了一例犬只, 全身体表淋巴结肿大, 通过临床检查以及淋巴结穿刺涂片、血涂片等细胞学检测, 诊断为淋巴瘤疑似病例。采用了多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙化疗方案, 结果外周淋巴结肿胀消失, 犬只精神食欲状况明显恢复, 生活质量也相应提高。4个月来未出现病情反复, 精神食欲正常。现报告如下:

1 基本信息

仔仔(化名)、雪纳瑞犬, 3岁, 已绝育, 体重5kg。正常免疫。2010年9月8日上午, 主人发现犬只的颈部、后肢出现肿块且具有对称性, 当天上下楼梯时发现左后腿跛行, 怀疑是下楼时扭伤后腿。

2 病史

2009年4月因外阴肿胀并有血性分泌物流出前来就诊, 诊断为卵巢残留综合症。2009年6月出现呕吐等症状之后诊断为胃肠炎。

3 临床检查

体温 38.3℃, 心率 84次/min, 呼吸 24次/min。该犬表现紧张、反应灵敏, 对主人极其依赖, 步态僵硬。触诊: 对称性下颌淋巴结、膈淋巴结、肩前淋巴结肿大, 有核桃样大小、坚硬, 无疼痛感(图1)。听诊: 左侧胸廓下1/3处收缩期杂音(四级)。

4 实验室检查

4.1 血常规检查 结果显示各项指标均正常, 血涂片也未发现异常情况。

4.2 生化检查 从表1可见, 该犬生化指标均在正常范围之内。通常患有淋巴瘤的犬可能会有高钙血症、尿素氮和肌酐增多、肝特异性酶水平升

高、球蛋白升高异常生化现象。



图1 肿大的下颌淋巴结(化疗前)

表1 生化检验结果

测试项目	结果	正常范围
白蛋白	3.8 g/dL	2.3~4.0 g/dL
碱性磷酸酶	105 U/L	23~212 U/L
谷丙转氨酶	10 U/L	10~100 U/L
淀粉酶	511 U/L	500~1500 U/L
尿素氮	19 mg/dL	7~27 mg/dL
钙	10.3 mg/dL	7.9~12 mg/dL
胆固醇	229 mg/dL	110~320 mg/dL
肌酐	0.7 mg/dL	0.5~1.8 mg/dL
球蛋白	3.1 mg/dL	2.5~4.5 mg/dL
葡萄糖	108 mg/dL	74~143 mg/dL
磷	4.4 mg/dL	2.5~6.8 mg/dL
胆红素	0.1 mg/dL	0.0~0.9 mg/dL

4.3 膈淋巴结细胞学检查 原发性淋巴肿瘤, 或称淋巴瘤, 以成淋巴细胞和有丝分裂增加为主要特征。细胞至少要显示三种以上的异常细胞核构型才能被鉴定为恶性。该病例出现细胞核仁明显(图2)、多核仁(图3)和有丝分裂相(图4), 同时可见大量的成淋巴细胞(图5)。

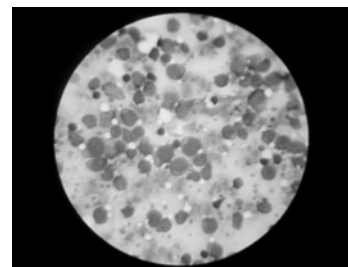


图2 淋巴细胞核仁明显

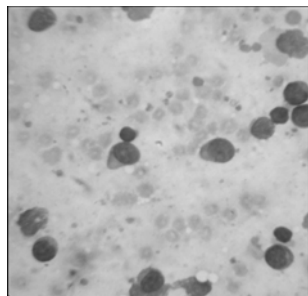


图3 淋巴细胞多核仁

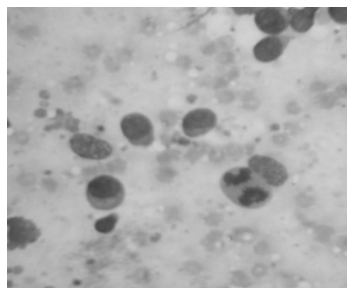


图4 有丝分裂相

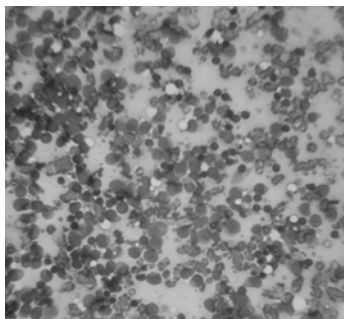


图5 大量的成熟淋巴细胞

4.4 IDEXX 4合一试剂盒检测 经检测,心丝虫、莱姆病、犬型艾利希体及马型艾利希体均为阴性。

4.5 布氏杆菌抗体检测 结果为阴性。

4.6 X射线检查 显示胸腔内未见异常;腹腔内肝、脾肿大(图6、图7)。

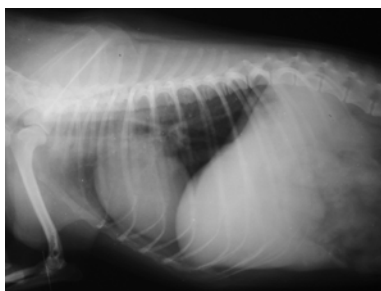


图6 脾脏肿大

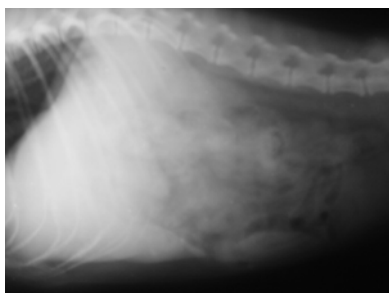


图7 肝脏肿大

4.7 B超检查 脾脏肿大,脾脏延伸至膀胱腹侧。其余未见异常。

4.8 骨髓穿刺 未见白血病样变化。

5 治疗

治疗淋巴瘤最有效的治疗方法是化疗。本病例应用多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松龙的方案进行治疗,在第9周淋巴结的肿胀基本消退,接受化疗后20周内精神食欲正常。

化疗过程具体如下:第1周:泼尼松每日口服给药直到第8周。长春新碱(0.6 mg/m²体表面积),环磷酰胺片剂(250 mg/m²),分2~4天服用。第2周:注射长春新碱(0.6 mg/m²)。CBC(全血细胞计数)。第3周:注射长春新碱(0.6 mg/m²)。CBC。第4周:注射长春新碱(0.6 mg/m²)并服用环磷酰胺(250 mg/m²)。第5周:CBC和肾功能检测。第6周:暂停,不进行化疗。第7周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第8周:CBC和肾功能检测,并在两周内逐渐停用泼尼松。第10周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第11周:CBC和肾功能检测。第13周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第16周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第19周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第20周:CBC和肾功能检测。第22周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第25周:注射多柔比星(25 mg/m²)。第26周:CBC和肾功能检测。

6 分析

该病例因跛行在触诊过程中发现全身淋巴结肿大,为查明体表淋巴结肿大的原因,进行淋巴结的细针穿刺抹片镜检、血常规生化检测、血涂片判读以及X光、B超、骨髓穿刺抹片,最后怀疑其为淋巴瘤,如需确诊最好是做组织病理学诊断。治疗癌症有三种常用的方法:手术、放疗、化疗。治疗淋巴瘤最有效的治疗方法是化疗,常用阿霉素化疗方案、阿霉素-环磷酰胺方案、环磷酰胺-长春新碱-泼尼松方案以及环磷酰胺-长春新碱-泼尼松-阿霉素方案等。根据各种化疗方案的优缺点以及主人的意愿,该病例选用环磷酰胺-长春新碱-泼尼松-阿霉素方案。该病例治疗后6个月内控制良好,未见反复。

丙泊酚在小动物麻醉上的应用简介

廖新权, 刘领汉, 谢光平, 段海军
(深圳布吉佰佳动物医院, 广东 深圳 518112)

中图分类号: S857.12*4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0045-02

1 丙泊酚的介绍

丙泊酚,又名异丙酚,英文名 propofol,为白色乳状液体,是在20世纪70年代合成的一种酚的衍生物,是一种新型安全的短效注射麻醉剂。在医学上运用十分广泛,近些年来国内兽医才逐渐开始使用。

丙泊酚相对于国内使用率较多的犬眠宝、速眠新的犬猫麻醉药物来说有起效快、时效短,可以在短时间内使动物进入诱导麻醉等优点,如作为一种全麻维持药物亦能在短时间内达到外科麻醉期的麻醉深度。该药物在医学运用十分广泛,皆因其在药物动力学和药物副作用上都比硫喷妥钠等诱导麻醉药物优秀,故无论是在医学的门诊手术、人流、剖腹产、脊髓造影、硬膜下麻醉,甚至骨科手术、心脏、颅脑手术等领域^[1]都有应用。而在兽医领域,该药物多作为中老年犬呼吸麻醉诱导药物,而在一些需时较短的常规检查、小手术上作为全麻维持药物,如X线的拍摄摆位,公猫去势术、公犬去势术、第三眼睑切除术等。

2 丙泊酚的药物动力学

丙泊酚一般用于静脉注射或静脉滴注,其在静注后30 sec到1 min即可起催眠麻醉作用,可以进行外科手术,大约在2 min左右即进入血药浓度峰值。在人身上的试验表明该药物麻醉维持期普遍在9.9 min^[2],而仅需要30~60 min即可经由肝脏代谢消除过半。其大部分以螯合物或代谢物形式从尿液排出,相对起替来他明和唑拉西泮等量混合制成的舒泰清除半衰期更快,而且麻醉深度与其无异^[3],故更适合用于小型手术。

3 用法用量

丙泊酚使用前应摇匀,如未配合其他术前药物,犬使用剂量为6.6 mg/kg;若用作手术前诱导麻

醉,联合应用阿托品或硫喷妥钠等,则用量可以减少为4 mg/kg。但无论剂量多少,都应该在1 min内缓慢静脉注射完毕。若用作维持麻醉,可用5%葡萄糖、乳酸林格氏液、生理盐水等溶液稀释,但是稀释后浓度不能少于2 mg/mL,并以0.4 mg/kg.min的速度进行滴注。猫则分别为8 mg/kg(无麻前给药)、6 mg/kg(有麻前给药)、0.51 mg/kg.min(维持)。

我医院从2010年开始引入丙泊酚作为诱导麻醉剂,到2010年11月为止已经使用过丙泊酚进行诱导麻醉约5次,X线拍摄摆位约8次,简短手术约7次,具体情况见表1。由于其代谢基本都为肝脏代谢,尚未出现任何麻醉事故,安全性值得信赖。在医学临床应用上,据资料显示有静滴丙泊酚7天以上病人,在后续的检查中并未发现有肝肾功能损害。

4 药物副作用

丙泊酚用作全麻诱导可使外周血管阻力下降、心肌抑制、心输出量减少以及抑制压力感受器对低血压的反应而引起血压下降,年老体弱、心功能不全患者血压下降尤其明显。对呼吸也有较明显的抑制作用,静注后常出现短暂的呼吸暂停。快速,大剂量注射,或用于低血容量或老年动物时可能引起严重低血压,故在进行静脉注射时需要在1 min内缓慢推注,以避免出现血压快速下降和呼吸暂停的现象。而具有癫痫及脂肪代谢障碍的患畜应小心使用^[4]。

5 总结

丙泊酚在医学领域使用由来已久,但是在我国兽医领域上的使用还不普遍,应用时间还不长,经验不多,往往在使用上会存在一些问题,但其诱导迅速、麻醉深度易控、代谢快、副作用轻、安全性高、价格适中等优点,是犬眠宝、速眠新等诱导麻

表 1 丙泊酚临床应用情况

名称	品种	年龄	体重	用途	剂量	苏醒时间	情况
波子	博美	1岁	1.5kg	X线检查	1 mL (10 mL/kg)	5 min	良好
小Q	银狐	11月	5kg	X线检查	2.5 mL (5 mg/kg)	7 min	良好,从苏醒到站立时间稍长
仔仔	蝴蝶	5月	6.4kg	第三眼睑切除	3 mL (5 mg.kg)	10 min	良好
小白	贵宾	1岁	5.5kg	X线检查	2.6 mL (5 mg/kg)	7 min	良好
小Q	银狐	1岁	5kg	X线检查	30 mg (6mg/kg)	10 min	良好
COCO	雪纳瑞	7岁	8.7kg	手术诱导皮肤肿瘤切除	48 mg (6 mg/kg)	30 min	气体麻醉
优优	德牧	13岁	19.5kg	手术诱导舌根肿瘤切除	49 mg (2.5 mg/kg)	15 min	良好
仔仔	挪威纳	5岁	26.5kg	手术诱导外伤处理	132.5 mg (5 mg/kg)	25 min	一般
小宝	京巴	1岁	4.8kg	X线检查	28 mg (6 mg/kg)	8 min	良好
乖乖	西施	3岁	6.5kg	第三眼睑切除	39 mg (6 mg//kg)	10 min	良好
小小	家猫	1岁	3.1kg	公猫绝育	24 mg (8 mg/kg)	10 min	良好
多多	拉布拉多	2岁	18kg	X线检查	100 mg (6 mg/kg)	13 min	良好
仔仔	雪纳瑞	4岁	6.7kg	X线检查	40 mg (6mg/kg)	8 min	一般
乐乐	蝴蝶	6个月	5.7kg	第三眼睑切除	23 mg (4 mg/kg)	12 min	良好

醉剂所无法比拟的,更适宜用于临床小动物简短手术上。随着临床应用的增多,和医学经验的借鉴,相信在不久的将来,丙泊酚也能广泛地应用在小动物各类手术上。

参考文献:

[1] 郑雯,汤小鹏,李霞,等.丙泊酚诱导及异氟醚维持麻醉对犬

(上接第 42 页)

当,如母犬过早配种、过度饲喂导致母犬营养过剩和胎儿过大、不及时防疫导致并发传染病等。因此,要减少小型犬难产的发生,要提高科学养犬的意识和饲养管理水平。

参考文献:

[1] Munnich A, Kuchenmeister U. Dystocia in numbers—evidence-based parameters for Intervention in the dog: Causes for dystocia and treatment recommendations[J]. Reproduction in Domestic Animals, 1999, 44 (2): 141-147.
 [2] 邓小琴, 卓国宁. 有关小型犬难产的探讨[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37 (3): 57.
 [3] Pretzer SD. Medical management of canine and feline dystocia[J]. Heriogenology 2008, 70 (3): 332-336.
 [4] 周云龙. 母犬难产的诊断与救治[J]. 福建农业, 2001, (12): 18.
 [5] 贺星, 亮李刚, 邓春梅, 等. 犬难产的诊断治疗及预防[J]. 中国工作犬业, 2005, (7): 12-13.
 [6] 兰罗勋. 孕犬难产的救助措施[J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28 (3): 119-120.

血气指标的影响[J]. 中国兽医杂志, 2009, (8): 60-62.
 [2] 丙泊酚的介绍[DB/OL]. <http://www.med66.com/html/2008/9/1i196823714149800213248.html>.
 [3] 李培德, 孙丽盈, 侯凤香. 小动物静脉麻醉研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42 (1): 90-91.
 [4] 林政毅. 犬猫常用药物治疗手册[M]. 台北: 艺轩图书出版社 2005. 339.
 [7] 刘小成, 潘峰. 犬的难产分析及助产[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2009, (4): 97.
 [8] 杜毅. 犬难产的原因分析及治疗[J]. 云南农业, 2007, (8): 20-21.
 [9] Valerie J, Wiebe, Pharm D, et al. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction[J]. Topics in companion animal medicine, 2009, 24 (2): 71-79.
 [10] 王伟. 小型犬难产的原因及防治[J]. 上海畜牧通讯, 2003, (5): 42.
 [11] 余春. 浅谈孕犬难产[J]. 畜牧兽医杂志, 2004, 23 (4): 9-11.
 [12] 徐海忠. 剖腹产手术母犬难产的体会[J]. 畜牧兽医科技信息, 2004, (6): 56-57.
 [13] 帅晓宏, 熊前, 邹恒. 犬难产的人工助产[J]. 养犬, 2005, (1): 22-23.
 [14] 李光金, 李宇刚. 犬的剖腹产手术探讨[J]. 中兽医学杂志, 2006, (4): 39-40.
 [15] 杨玉芬, 高花英, 普仕华. 犬难产的原因及预防处理[J]. 云南畜牧兽医, 2006, (6): 35-36.
 [16] 丁国志, 吴文平. 犬难产的综合防治[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2001, 3 (1): 37-38.
 [17] 徐贺春. 如何避免小型犬难产[J]. 当代畜禽养殖, 1997, (5): 6.

规模化猪场人工授精的细节管理

张欣, 崔敏

(烟台龙大养殖有限公司, 山东 莱阳 265209)

摘要: 人工授精技术在规模化猪场应用日益广泛但细节操作不当使配种后母猪子宫炎、早期返情现象频频出现, 导致受胎率低、产仔数少, 细化人工授精管理方能提高种猪生产性能。

关键词: 人工授精; 细节管理

中图分类号: S814.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0047-02

人工授精自上世纪九十年代在我国迅速推广以来, 为提高种猪繁殖性能、改良种猪品种起到了举足轻重的作用。人工授精效果直接关系到规模化猪场生产成绩和经济效益的高低, 主要包括: 公猪营养、健康、管理、圈舍、年龄和担负能力; 精液采集; 生物安全、卫生以及温度控制; 精液品质鉴定; 精液储存和运输; 记录和追踪; 输精时的环境卫生和个人卫生。提高生产性能需要不断提高人工授精的技能, 完善管理, 减少失误。本文结合自身猪场人工授精存在的问题进行探讨, 并提出实用的解决方案。

1 配种前母猪检查

决定是否给母猪配种前, 首先要检查母猪的体况是否适合配种, 以免失败(如是否有返情、子宫炎、肢蹄受伤等)。母猪存在以下问题时, 不适合配种: (1) 肢蹄问题(蹄部损伤); (2) 隐性子宫颈炎; (3) 乳头问题(扁平乳头、内陷乳头); (3) 伤残; (4) 外生殖器发育不良(幼稚型、严重上翘型阴户)。

在空怀期应检查母猪档案以及健康情况: (1) 胎龄过大, 胎次大于 7 胎; (2) 每胎产仔数少于 7 头, 且胎次在 2 胎以上的母猪; (3) 肢蹄损伤或有坏疽; (4) 患慢性消耗性疾病; (5) 子宫炎经过处理后仍反复发作; (6) 繁殖障碍。有以上之一症状的母猪应予以淘汰。

2 采精频率适当

采精频率一般为成年公猪 2 次/周, 青年公猪 1 次/周。多数公猪习惯于给定的采精频率, 一旦习惯形成, 通过增加采精频率不会提高精液产量, 反而会降低精液品质(未成熟精子数量偏多)。为获得理想的精子量, 采精频率的稳定比采精频

率本身还重要。

3 精液品质控制

3.1 温度控制 温度控制在精液采集、稀释和保存过程中至关重要。高温促进精子运动, 不利精液保存; 低于 10℃ 会导致精子冷休克。(1) 所有与精液接触的器具、稀释液必须预热到 37℃; 环境温度控制在 22~25℃; 传递窗口设红外灯 1 个, 对预热的保温杯进行保温。(2) 精液稀释时需 2 支温度计测定温度。精液杯中 1 支, 稀释液中 1 支, 2 支温度计必须经过校正, 切忌交叉使用。(3) 稀释后的精液在室温下保存 2 h 后, 置于 17℃ 冰箱保存, 每天定期测定冰箱温度。

3.2 精液检测 (1) 用于生产的公猪每次使用前必须检测精液颜色、气味, 采精量, 精子密度、活力, 并记录备案。(2) 定期开展精子畸形率的检测。用于商品猪场的精子畸形率超过 18% 的需要进一步检测。

4 发情鉴定

发情判断的准确性在配种过程中十分重要。受胎率高, 窝产仔数多的关键因素是判断发情和配种方式, 猪场技术人员必须具有高度责任心方可胜任!

每日用试情公猪对待配母猪进行试情是鉴定母猪是否发情的最有效方法, 可采用人工查情与公猪试情相结合的方法进行检查。配种员所有工作时间的 1/3 应放在母猪发情鉴定上, 关键是找到母猪发情的“零点”, 即母猪发情的最高点。

4.1 发情表现 (1) 阴户红肿, 阴道内有粘液性分泌物, 阴道黏膜颜色由苍白变为潮红; (2) 目光呆滞, 频频排尿; (3) 神经质, 食欲差; (4) 压背静立

不动,后腿叉开,耳根竖起,尾根上翘;(5)互相爬跨并接受公猪爬跨;(6)阴道内湿润。

4.2 发情鉴定步骤 (1)每日2次进行发情鉴定,让公猪在母猪前走动。(2)每3人一组检查母猪发情,一人控制公猪,一人骑在母猪背上,一人检查发情症状,标记配种时间。(3)发情鉴定完毕后,将公猪赶回公猪舍。在输精前1h发情母猪不再受到公猪刺激,防止公猪和母猪出现“性不应”现象。

5 配种模式

当前配种模式一般输精2次/情期,生产中还要根据外阴黏膜色泽和粘液、断奶后发情时间的早晚以及“静立”时间的长短灵活掌握,如果前两次配种状态较差,可以增加一次配种。具体参照表1执行。

表1 输精时间表

断奶至 发现发情 时间	输 精 时 间					
	每天两次发情鉴定				每天一次发情鉴定	
	上午(AM)		下午(PM)		上午(AM)	
	7:00~9:00	14:00~16:00	7:00~9:00			
	输2次	输3次	输2次	输3次	输2次	输3次
3~6天	1PM ¹⁾	1PM	2AM	2AM	1AM	1AM
	2AM	2AM	2PM	2PM	2AM	2AM
		2PM		3AM		2PM
6天以上	1AM	1AM	1PM	1PM	1AM	1AM
	2AM	1PM	2AM	2AM	2AM	1PM
		2AM		2PM		2AM
后备母猪	1AM	1AM	1PM	1PM	1AM	1AM
	2AM	1PM	2AM	2AM	2AM	1PM
返情母猪		2AM		2PM		2AM

1):1代表当天,2代表第二天,3代表第三天。

但要注意在配种前,若发现发情表现已经消失或将要消失,不要再配种或试图刺激其发情。因为再配种或试图刺激其发情,子宫炎或早产将于3~5周后出现。

6 输精

6.1 输精前的消毒 用清水清洗后用干毛巾或一次性纸巾擦干外阴部、尾根和臀部周围。目前猪场多使用0.1%的高锰酸钾溶液,但必须做到现配现用,消毒时必须将毛巾拧干,防止母猪发情时将消毒液吸纳。

6.2 输精时公猪的管理 输精时,公猪必须在场,公母比例以1:4为宜。需要有专人对公猪进行管理。

6.3 输精时间 输入精液的黄金时间只有4~6min/次·头,这个时间段内输入精液能得到最大的窝产仔数。

6.4 输精后母猪的管理 人工授精后,为防止精液倒流,配种员每次最多给5头猪进行人工授精(便于管理),输精结束后公猪停留15min,配种员关注母猪,防止母猪卧下,导致精液倒流。

6.5 输精操作的跟踪分析 输精评分的目的在于如实记录输精具体情况,便于以后在返情或产仔少时查找原因,在以后的工作中改进措施。输精评分分为三个方面三个等级:(1)站立发情:1分(差),2分(一些移动),3分(几乎没有移动)。(2)锁住程度:1分(没有锁住),2分(松散锁住),3分(持续牢固紧锁)。(3)倒流程度:1分(严重倒流),2分(一些倒流),3分(几乎没有倒流)。

具体评分方法:比如1头母猪站立反射明显,几乎没有移动;持续牢固紧锁;一些倒流,则此次配种的输精评分为332,不需求和。

6.6 输精后母猪后躯卫生 母猪后躯卫生状况与猪舍限位栏有密切关系,漏缝地板明显好于全水泥地面。配种前后各7天重点关注后躯卫生,防止管理上造成的生殖系统感染。

7 人员管理及员工技能培训

人员管理永远是最重要的。首先是选对人,一定要把员工的综合素质放在第1位,不怕基础差就怕不认真。如果配种硬件都不错,成绩总上不去,那很可能就是人员水平或责任心的问题。如果人员技术没问题,那就是管理问题,没有合理的机制调动他的积极性,如害怕员工多拿工资甚至在生产成绩差的情况下克扣工资。

规模化猪场要有良好的操作规范,及时详细地更新资料,把培训新员工和老员工持续接受教育作为猪场管理的重点。训练有素的工人对猪的健康、福利、生产力以及利润有着积极的影响。通过不断培训,增加工作经验,提高工人的技能,管理好工人才能保证猪场各种体系的有效运行,达成预期目标。

总之,影响母猪年生产力的主要因素有:配种的技能、精液品质、断奶母猪的健康状况和怀孕母猪群的管理。在人工授精操作中仍有许多值得细致推敲的地方,唯有将每一个细节问题考虑周全,做到一丝不苟,不断提高,种猪生产力改善指日可待。

猪粪便综合利用情况及建议

吴幸芳

(龙门县畜牧兽医渔业局, 广东 惠州 516800)

摘要: 本文阐述了龙门县猪粪便综合利用情况, 分析目前龙门县猪粪便综合利用存在的问题, 并提出粪便综合利用方式, 变废为宝, 使猪场粪便饲料化、能源化、肥料化, 倡导发展生态健康循环特色养猪业。

关键词: 猪粪便; 综合利用

中图分类号: S816.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0049-02

猪场粪便处理一直是环境保护关注的热点问题。猪粪便的处理问题不解决, 将会制约养猪业的健康发展。本文就龙门县猪粪便综合利用情况做详尽阐述, 分析目前龙门县猪粪便综合利用存在的问题, 并提出粪便综合利用方式, 变废为宝, 使猪场粪便饲料化、能源化、肥料化, 倡导发展生态健康循环特色养猪业。

1 龙门县养猪业粪便概况

1.1 龙门县养猪业的发展概况 随着人们对肉食品需求量的增多, 龙门县的养猪业得到较快发展(见表1)。从2006年开始我县生猪年出栏量呈增长趋势。2009年出栏量17.28万头, 生猪年饲养量29.03万头。2009年(见表2)龙门县年出栏量达100头以上的生猪饲养户有75户, 年出栏量100头以下的生猪饲养户有806户。

表1 龙门县生猪养殖情况

年份	生猪年出栏量(万头)	生猪年饲养量(万头)
2009	17.28	29.03
2008	16.36	28.57
2007	13.07	21.12
2006	12.13	19.03

表2 龙门县2009年养猪场规模统计表

规模	猪场数量(户)
年出栏量100头以下	806
年出栏量100~499头	75
年出栏量500~999头	54
年出栏量1000~1999头	14
年出栏量2000~9999头	6
年出栏量10000~49999头	2

1.2 龙门县猪粪便产生量与综合利用情况

1.2.1 龙门县养猪业粪便产生量概况 畜禽的

粪尿排泄量与动物种类、品种、性别、生长期、饲料、天气条件等因素有关。表3为我国畜牧业排放系数(苏绍眉, 1992), 表4为日本农业公害手册提出的畜禽粪尿污染物排泄系数。参考表3、4及上海市农业科学院畜牧研究所的畜禽粪便排泄系数(黄沈发, 1994), 得出表5中的畜禽粪便排放系数。由此可估算出龙门县2009年生猪污染物排放量(见表6)。由表6可知2009年龙门县生猪粪便的年产生总量为31.352万吨, 污染物五日生化需氧量(BOD₅)为1.045万吨, 化学需氧量(COD_{Cr})为1.390万吨, 氨氮(NH₃-N)为0.209万吨。

表3 畜牧业粪便排放系数

单位: kg/头·d

畜禽名称	排放量(L/头·d)	SS ¹⁾ 排放系数	BOD排放系数	N排放系数	P排放系数
牛	40	3.60	0.80	0.20	0.065
猪	6	0.70	0.20	0.04	0.025

1): SS: 悬浮物; BOD: 生化需氧量

表4 日本采用的畜禽粪尿及污染物排泄系数

单位: g/头·d

畜禽名称	粪	尿	BOD ₅ ¹⁾	COD _{Cr}	NH ₃ -N
奶牛	25000	10000	639	1100	55
肉猪	3000	3000	201	266	4.5
肉鸡	100	-	6.5	9.0	0.12

1): BOD₅: 五日生化需氧量; COD_{Cr}: 化学需氧量; NH₃-N: 氨氮

1.2.2 龙门县养猪业粪便综合利用概况 当前龙门县养猪业集约化程度不高, 猪粪便综合利用比较低效。第一是收集粪便, 用作有机肥。这是大多数猪场对猪粪便处理的常用方式, 污水直接排放到鱼塘或者种植地, 让农作物直接消纳污水。这种简单式的粪尿利用率很低, 同时也造成了空气和水体污

染。第二,建立沼气池进行粪污处理。部分猪场采用这种方式,但是这样的猪场户数所占比例很少(见表7)。由表7可知,龙门县养殖场规模较小,猪场配有沼气池的比例较低。存栏量1000头以上的猪场户数为22户,其中配有沼气池的有16户,配有沼气池的比例为72.72%;存栏量100~999头猪场户数为129户,其中沼气池的有10户,配有沼气池的比例为7.75%;存栏量5~99头猪场户数为806户,其中配有沼气池的有220户,配有沼气池的比例为27.30%。第三,猪舍建立发酵床利用粪便。虽然目前很多集约化猪场在小、中猪阶段都是采用发酵床的方式利用猪粪,还能起到保温作用。但在我县建立发酵床利用粪便的猪场不多,使用这种方式利用猪粪便的猪场只有1户。

表5 畜禽粪便年排放系数

单位:kg/头

畜禽名称	粪	BOD ₅	COD _{cr}	NH ₃ -N
牛	14600	292	401.5	73
猪 ¹⁾	1080	36	47.88	7.2
鸡	2.75	0.2475	0.495	0.033

1):生猪生长期为180d,肉鸡按55d计。

表6 龙门县2009年养猪业污染排放量

单位:万t/年

畜禽名称	粪	BOD ₅	COD _{cr}	NH ₃ -N
猪	31.352	1.045	1.390	0.209

表7 龙门县养猪场配套沼气池情况统计

规模	猪场数量(户)	配有沼气池猪场(户)	比例(%)
存栏量1000头以上	22	16	72.72
存栏量100~999头	129	10	7.75
存栏量5~99头	806	220	27.30

2 龙门县猪粪便综合利用存在的问题

近年来,在国家的一些利好政策及市场的利好导向下,我县养猪业规模得到了较大发展,但是在发展的背后带来的粪便处理问题也不容忽视。目前我县在养猪业废弃物综合利用虽然颇有成绩,但是还存在一些问题,制约着猪粪便综合利用,也制约着生态养猪业发展的进程。

2.1 资金短缺,配套设施落后 资金短缺问题已经成为养猪业粪便综合利用最大制约因素。国家和地方专项投资很少。在目前的技术经济条件下,企业完全依靠自身一次性筹集猪粪便治理资金并承担日常的运行费用,还相当困难。养猪场配套的粪便处理设施比较简陋,只是简单的沼气池或是鱼塘

氧化池。大部分养猪场在建场初期为通过环评而建立的沼气池也只是一个摆设,很少投入运行使用。

2.2 分布零散,规划不合理 我县猪场的布局缺乏合理规划,分布零散,家庭散养户大量存在。这样的猪场布局,单个猪场产生的废弃物量较少,且由于猪场的场址与种植园区较远,猪粪的运输成本高,猪粪无法在种植业中被及时合理地消化。由于分布散,粪便产生量少,经常是堆放一段时间才集中处理,粪便在堆放过程中由于雨水的冲洗,造成污水横流,污染水体;堆放时产生大量的氨、硫化物、甲烷等有毒有害成分造成空气污染。分布零散,规划不合理不利于猪粪集中处理,使粪便得不到充分利用,这是制约猪场粪便综合利用的一个重要因素。

3 养猪业粪便综合利用方式的建议

3.1 转变养猪理念,发展生态健康循环特色养猪业 生态健康养殖是畜牧业可持续发展的有效途径。在当前环境生态友好与健康养殖引起全社会高度关注的大背景下,广东省率先提出“发展生态与健康养殖,加快建设畜牧业强省”。我县应该引进先进经济理念,转变养猪业发展方式,综合利用猪粪便,发展生态健康循环特色养猪业。

以循环经济理论为指导的养猪循环经济强调把猪养殖生产活动由过去的“自然资源-生猪-生猪废弃物”的物质单向流动组织成“自然资源-生猪-生猪废弃物-再生资源”的物质反馈式循环过程,所有的物质和能源要在不断进行的农业循环中得到合理和持久的利用,以实现资源的充分利用,减少最终排放废物的产生量,防止环境污染。

3.2 搞好生态养猪业规划,建好集中处理粪便设施 要结合目前新农村建设和畜牧业发展优势和发展潜力,规划当前和今后一个时期生态畜牧业经济发展重点、方向。做到统一规划、合理布局、相对集中,规范养殖。在新农村规划中,要在远离村屯500米以外预留出充足的牧业用地,规划养殖小区,为畜禽养殖从庭院转移出来创造必要的条件。对于集约化猪场,要求猪场建粪便处理设施。对于非集约化猪场,由政府按照养殖小区规划建设粪便处理设施。做到集中收集粪便,统一处理。还可以在丘陵山地建立种植业生猪养殖基地或园区,养猪产生的粪便由当地种植业直接消纳。

3.3 多措并举,综合利用猪场废弃物 全国各养殖地区应该多措并举,综合利用猪场粪便,实现猪

(下转第52页)

节后猪价不降反涨 养猪行情仍被看好

虞 华

(国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005)

中图分类号: S8-1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)02-0051-02

往年的春节之后,猪价同其他消费品一样,进入消费淡季,猪肉价格相对会出现回落,生猪价格相应会迅速下降。但今年却有所不同:春节后生猪价格不跌反涨。业内人士分析,2011年,猪肉市场价格总体平稳向上,养猪行情也将看好。预计生猪生产和市场价格将进入新的周期,养殖利润继续增加,但受成本上升压力的影响较大,积聚的市场风险也在不断加大。

1 一季度国内生猪市场情况

1.1 生猪存栏略有下降 据农业部畜牧业司监测数据显示,2011年1月全国生猪存栏量为44 510万头,其中能繁母猪4 740万头,与上年12月相比,生猪存栏量减少1.92%,能繁母猪减少0.17%;与去年同期相比,生猪存栏量减少2.18%,能繁母猪减少2.67%。

1.2 规模企业生猪屠宰量增加 由于生猪出栏量增加,2008年以来全国规模以上屠宰企业生猪屠宰量再创新高。据中国政府网公布,2008-2010年,全国规模以上屠宰企业生猪屠宰量分别达1.68亿头、2.08亿头和2.28亿头。从月度同比看,1-12月份全部实现增长。商务部日前发布的资料显示,今年1月全国规模以上生猪定点屠宰企业屠宰量为2 468.9万头,比上年12月增加11.6%,与去年同期相比增加16%。

1.3 养猪利润与成本双双增加 2011年3月以来玉米、豆粕价格继续上涨,养殖利润略有压缩,但3月上旬自繁自养头均盈利仍高达350元/头,整体盈利仍非常可观。仔猪、二元母猪补栏积极性继续高涨,仔猪价格同比涨幅已超70%。

1.4 猪肉及生猪价格继续上涨 兔年春节过后,不少消费者发现市场上的猪肉价格还和春节时差不多,有些地区生猪价格不跌反涨。从2011年开始,猪肉价格出现持续上涨,2011年3月7日已达21.87元/kg。受猪肉价格上涨的带动,上游养

殖业产品在春节后的价格表现均较为突出。2月份,全国猪价较为强势,均价14.63元/kg,同比大幅上涨42.2%,北方局部突破15.0元/kg,南方湖南、广东等地价格已逼近16.0元/kg。2011年3月7日全国生猪价格均价为14.8元/kg,比1月7日的13.1元/kg上涨了13%,同比涨幅一举突破50%。猪肉价格同比涨幅略低些,在35%左右。

2 后期养猪行情看好

由于我国猪肉的消费占肉类消费总量的65%左右,因此我国的肉类定价主要参考猪肉。而近期猪肉价格的超预期上涨主要来自两方面因素:一是2010年以来生猪供应不足,而猪肉消费持续稳定增长。二是2009年以来的粮食价格、人工成本等持续上涨导致养殖业的成本刚性提升,未来将会陆续传导至下游。可以预计,始于2010年7月的本轮猪肉价格上涨是趋势性的行情,高猪肉价格将会贯穿2011全年。即使2011年的猪肉平均价格维持2010年底的价位(13.61元/kg),也会比2010年的平均价格11.78元/kg高出15%。一旦猪肉价格进一步上涨,那么2011年平均价格的涨幅将会突破20%。

2.1 猪肉供应仍有保障 目前,全国能繁母猪存栏数量、比重均高于理论上的合理值(4 200万头,9%),预示2011年生猪生产比较稳定,供给仍有保障。从国内能繁母猪生产水平来看,预计2011年前三季度全国生猪存栏趋势应与2010年3月份后的能繁母猪存栏变化情况基本一致。

2.2 肉菜比价导致猪肉需求仍有上升空间 按“十二五”规划,居民收入与国民经济增速同步,预计增速7%,2011年猪肉需求刚性增加,但季节、节日因素对猪肉需求的影响仍比较突出:上半年偏少,下半年偏多的格局。

2.3 生猪饲养成本高位运行、居高难下 2010年生猪市场供求可谓基本平衡,生猪及猪肉价

格上涨的一个很重要的因素是成本推动，可以预见，2011年养猪成本对价格的推动力会进一步增强。受国家提高2011年小麦最低收购价、玉米价格坚挺、社会流动性充裕、物价上涨传导、人员工资提高及防疫费用较高等因素影响，预计2011年养猪成本仍将走高，支撑猪价处于较高水平。

2.4 后市行情渐好，价格稳中有升 兔年春节后生猪供需略显失衡，迫使商家提价收购。目前这种“缺货”的情况还会维持一段时间，因为目前农民补栏的积极性并不高。综合各因素分析，主要归结于成本上涨延续。以人工成本为例，去年养猪工人的保底工资为1 000元，加上奖金、食宿等费用，每月约1 500多元。现在保底工资为1 700元，加上各种费用，每月约2 000多元。再加上饲料成本上涨等因素，存栏量为1万只的猪场每年需多支

付40万元的费用。此外，去年夏季的持续高温天气对母猪的配种、繁殖造成了不小影响，导致崽猪的出产量有所下降；而春节前生猪的大量集中出栏也一定程度上透支了生猪的存栏数量，导致节后出栏量明显下降。也正是因为这些因素，2011年养猪行情会好于去年，全国猪价均价有可能逼近15元/kg，局部阶段性最高可能达到16元/kg左右。最高点可能出现在5月份前后。猪肉的价格会随之小涨，但估计不会大涨。

2.5 养殖风险加大 今年疫病仍是养殖户心头大患。原本存栏之所以下滑如此严重就与疫病有关，补栏谨慎也是出于对疫病的担忧。现时中小猪存栏比重较大，一有疫病养殖户损失巨大。疫病防控是当前养殖的关键。考虑到成本问题，后期补栏风险或将加大。

(上接第50页)

粪便的能源化、饲料化、肥料化(见图1)。

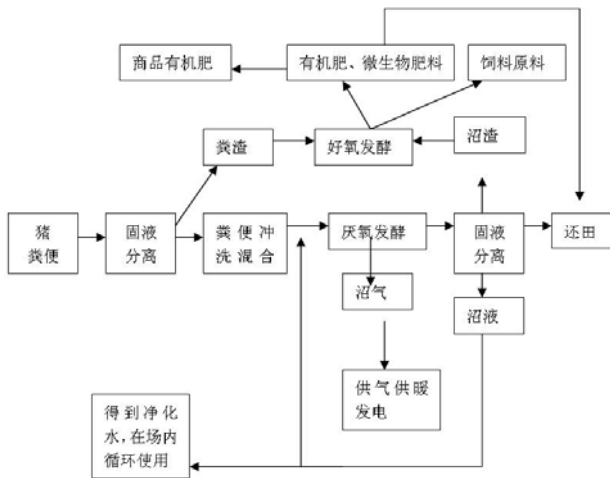


图1 猪场粪便综合利用示意图

3.3.1 猪粪便饲料化。猪粪便经过好氧或厌氧发酵处理，把发酵后的猪粪做成饲料原料，开发为非常规饲料原料。猪粪便发酵可根据不同条件和需要，利用水泥地面或各种窖、罐、池等堆放场地或储存容器，采取耗氧发酵法、厌氧发酵法、青贮发酵法、两段发酵法等不同发酵方法，对其进行微生态发酵处理，可以除臭灭菌，降低毒素，提高营养，变香变软，使猪粪便和其他农副产品下脚料转变为畜禽容易消化的饲料原料。应用微生态发酵技术处理猪粪便，达到了消除环境污染，改善饲料

品质，降低饲养成本，提高养殖业经济效益的目的。猪粪便经发酵后用于养殖蚯蚓和蛆，可取得蛋白质含量高的饲料蛋白粉。

3.3.2 畜禽粪便能源化。建造一定体积的沼气池，将猪场废弃物经收集后进入沼气池发酵，得到的沼气可作供气供暖发电用。养猪场可以因地制宜建立沼气池。集约化养猪场，建设集约化大中型养猪种植生态园，养猪场配备沼气池。非集约化，政府选址，建设区域沼气池，形成分散养殖，集中收集处理废物的处理模式。

3.3.3 畜禽粪便肥料化。经沼气池发酵后沼渣可颗粒化制作成有机肥，用于绿色种植。此外，可将猪粪液混合甘蔗渣或秸秆等农作物下脚料进行堆沤发酵，然后添加一定的目标菌剂制成微生物肥料开拓农业肥料的新品种。

4 小结

当前，生猪养殖业发展带来的猪粪便处理问题制约着生猪业的健康可持续发展。就目前养猪业猪粪便的综合利用情况来看，我们应该大力提倡多途径综合利用猪粪便，使猪粪便饲料化、能源化、肥料化。

参考文献:

[1] 苏绍眉. 建设项目环境保护实用手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992. 325.

[2] 黄沈发, 陈长虹, 贺金峰. 黄浦江上游汇水区禽畜业污染及其防治对策[J]. 上海环境科学, 1994, 13(5): 4-8.

《兽医临床难病新解》简介



售价35元/本（含包装邮费）

兽医临床工作者廖斌发、廖启武编著的《兽医临床难病新解》一书已于近期由湖北科学技术出版社出版，面向全国公开发行。

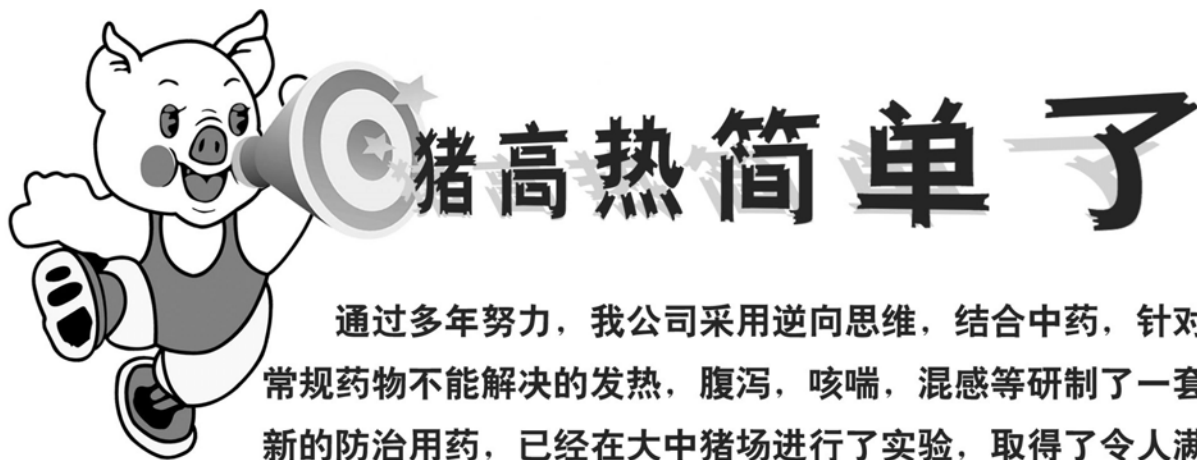
书中就当前流行或散发的猪瘟、疑似猪瘟、圆环病毒病、蓝耳病、伪狂犬病、链球菌病、水肿病、附红细胞体病、无名高热等病毒、细菌、原虫病及其混合感染的温热病等一百多个热门话题，运用中兽医模糊黑箱理论，通过病例，新解难病，治法独特，疗效灵验，且具有现代科学性、时髦实用性、简单操作性。可谓是一书在手，解难不愁。可供养猪场、养殖专业户及广大农村基层畜牧兽医技术人员在兽医临床实践中参考，也可作为农业大专院校师生和科技人员启迪资料。

附言该书售价35元/本需要从邮局汇款到湖北省天门市根瘟灵研究所（马湾）廖斌发收，邮编：431715
汇单附言栏内注明“难病新解”和购书人电话

联系电话：0728—4561354（兼传真）

手机：13872992321

13707222763



通过多年努力，我公司采用逆向思维，结合中药，针对常规药物不能解决的发热，腹泻，咳喘，混感等研制了一套新的防治用药，已经在大中猪场进行了实验，取得了令人满意的效果，为以后在猪高热病治疗领域少走弯路开辟了一条全新的道路。

诚征乡镇，县级代理

南昌中科动物保健品有限公司

电话：4006503099 全国物流速递中心：05392191319

联系人：杜经理 13854921522 短信发送：13426253859

QQ：1399960906

网址：www.cnzkdb.com