

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 王贵平 舒鼎铭

孙彦伟 蔡建平 王政富 刘彩霞

特邀编委:

陈 峰 陈大毅 黄小建 陈小云

郑庆禄 贺湘仁 李 岩 林旭埜

陈瑞爱

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdaxmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:4月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



本刊声明:本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》和“万方数据—数字化期刊群”。作者稿件一经本刊录用,将同时被上述三个数据库收录,进入因特网提供信息服务。作者如不同意,请在投稿时向本刊声明,否则本刊将视为同意收录。凡被本刊刊发的稿件,将一次性支付作者著作权使用报酬。

目 录

·专题综述·

- PRRS 检测技术的研究进展.....黄 伟,陈进会,等(3)
- 动物专用大环内酯类新药——泰拉霉素.....亢继俊,王丽霞,等(7)
- 固体分散体在兽药制剂开发中的应用.....梁志凌,马江耀(11)
- 动物屏障系统的环境质量控制.....曹君君(14)

·畜牧技术·

- 陶赛特羊杂交改良本地羊的效果观察.....李寿林,仲万旭(16)
- 2010年上半年广东地区肉鸡行情分析.....黎剑雄,梁伯财,等(17)
- 我省中小型猪场的生存空间.....余德谦(19)

·兽医临床·

- 一例猪弓形虫病的诊治与体会.....石伟明,肖碧青(21)
- 猪沙门氏菌病的综合防治.....孙凌志(22)
- 一例鸽蛔虫病的诊治.....丁 宁,秦永康,等(24)

·试验研究·

- 木瓜蛋白酶和苜蓿对断奶仔猪生长性能的影响.....刘景环,王永雄,等(25)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒 E 基因的克隆及其腺病毒表达载体的构建.....
.....邓碧亮,顾万军,等(28)
- 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白 B 细胞抗原表位预测.....
.....李 玉,李功勇,等(31)
- PRRSV 高致病性毒株 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立.....
.....赵泽坤,王 娇,等(36)
- 乳化复合液体维生素制备工艺的初步研究.....梁明娜,周玉武,等(39)
- 猪链球菌、巴氏杆菌二联四价灭活疫苗的研制.....郭沈涛,游启有,等(42)

·宠物园地·

- 可吸收手术缝合线的研究进展.....何理平,吴端生,等(44)
- 浅谈 2 例术后急性喉头水肿.....吴子峻,戴 庶(48)

·经验交流·

- 在巴布亚新几内亚坎德普地区的养猪经验介绍.....饶仕军(50)
- 亚洲象牙龋炎的诊断和治疗.....蓝荣彬(52)

·信息之窗·

- 2010“永顺杯”优秀论文评选启事.....(38)
- 欢迎订阅本刊.....(49)
- 我国春季重大动物疫病防控工作进展顺利.....(51)

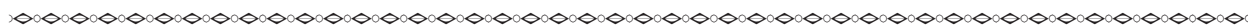
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2010 Volume 35,Number 2 (Total No.150)

Main Content

- Research progress on detection methods for PRRS*.....Huang Wei, Chen Jinhui, et al(3)
- A new macrolide antibiotic tulathromycin for animals*.....Kang Jijun, Wang Lixia, et al(7)
- The application of solid dispersion on the development of veterinary medicines*.....
..... Liang Zhiling, Ma Jiangyao (11)
- Regulation of environmental quality in barrier system of animals* Cao Junjun(14)
- The hybrid results of Taosaite sheep with local sheep*..... Li Shoulin, Zhong Wanxu(16)
- The market quotation of broiler industry in Guangdong area in the first half year of 2010*
.....Li Jianxiong, Liang Bocai, et al(17)
- The survival analysis for development of small and medium-sized pig farms in Guangdong province* ...
..... Yu Deqian(19)
- Diagnosis and treatment of one case of pig toxoplasmosis*.....Shi Weiming, Xiao Biqing(21)
- The integrated control on pig salmonellosis* Sun Ling zhi(22)
- Diagnosis and treatment of one case of pigeon ascariasis*..... Ding Ning, Qin Yongkang, et al(24)
- Effects of papain and alfalfa on growth performance in weaned piglets*.....
.....Liu Jinghuan, Yu Yongxiong, et al(25)
- The clone of E gene of PRRS virus and construction of its adenovirus expression vector*.....
.....Deng Biliang, Gu Wanjun, et al(28)
- B cell epitopes prediction of VP2 protein of IBDV*..... Li Yu, Li Gongyong, et al(31)
- Development of a RT-PCR method for the differentiation and identification of the highly pathogenic*....
PRRSV.....Zhao Zekun, Wang Jiao,et al(36)
- The preparation procedure for compound vitamins solution*.....Luan Mingna, Zhou Yuwu,et al(39)
- Development of the 4-valent inactivated vaccine against Swine streptococcus and pasteurilla*.....
.....Guo Shentao, You Qiyu, et al(42)
- Research progress on the absorbable suture in surgery*.....He Liping,Wu Duansheng,et al(44)



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

PRRS 检测技术的研究进展

黄伟¹, 陈进会^{1*}, 颜其贵², 冯迎春²

(1. 东莞出入境检验检疫局, 广东 东莞 523072; 2. 四川农业大学动物医学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 猪繁殖日常呼吸综合征是引起母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状及死亡为主要特征的一种高度接触性传染病。及时发现和日常监测对本病的防治和根除有重要意义。除病毒分离、鉴定的经典方法外, 更多的分子生物学检测、诊断技术得到广泛应用, 本文就各种检测技术的研究进展做一综述。

关键词: PRRS; 检测技术; ELISA

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0003-04

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) 是引起母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状及死亡为主要特征的一种高度接触性传染病。各种日龄的猪均可感染。母猪的繁殖障碍可表现为流产、产死胎、木乃伊胎、弱仔等。新生仔猪的死淘率增加; 哺乳仔猪的呼吸道症状则表现为高热、呼吸困难等肺炎症状^[1]。该病 1987 年首次在美国明尼苏达州发现, 随后几年许多国家和地区都有报道, 目前已遍及北美、欧洲及亚洲, 给世界养猪业带来了巨大的经济损失。1991 年初我国台湾开始出现本病, 1996 年郭宝清在我国大陆首先报道此病。由于病死猪呈现特征性的耳发绀现象, 故该病又被称为猪蓝耳病。其病原 PRRS 病毒 (PRRSV) 由荷兰 Lelystad 兽医研究中心于 1991 年 7 月首先分离出来 (当时称为 Lelystad 病毒, LV)^[2], 随后各国兽医科技界对此进行了全方位研究。由于 PRRS 与其它许多引起猪繁殖障碍综合征的疾病 (如猪细小病毒病、伪狂犬病、猪瘟、日本乙型脑炎、布氏杆菌病、钩端螺旋体病等) 有非常类似的临床症状, 不同猪群体及 PRRS 不同阶段的临床症状差异也很大, 且常有细菌性或病毒性疾病的继发或并发感染, 本病诊断很困难。

2006 年 5 月起我国南方地区大规模爆发的“猪高热病”已确诊为高致病性猪蓝耳病。因此, 要控制和根除该病, 加强对此病的及时检测尤为重要, 本文就该病的检测技术研究进展作一综述。

1 病毒的分离、鉴定

1.1 病料的采集处理 PRRSV 可以在多种临床样品中分离到, 包括血清、血浆、外周血单核细胞、骨髓、扁桃体、肺、淋巴结、脾、胸腺、心、脑、肝、睾丸和精液等, 其中血清和肺灌洗液最适合用于病毒分离。如取初产母猪的流产胎儿、死胎、木乃伊胎及弱仔的脑、肾、睾丸、肠系膜淋巴结或母猪的胎盘和阴道分泌物, 病料按 1/5~1/10 比例, 加入含青、链霉素各 1 000 IU 的 Hanks 洗液, 研磨至乳状, 4℃ 冰箱过夜, 3 000 r/m 离心 10 min, 取上清液 -20℃ 保存备用。

1.2 病毒的分离 病毒分离是诊断该病最确切的方法, 一般采用适应细胞 (或易感细胞) 分离法。目前用于分离 PRRSV 的细胞主要有如下几种: 猪原代肺泡巨噬细胞 (PAM)、CL2621 细胞、MARC-145 (M104 细胞系的克隆株)。新近又从 MARC-145 中克隆出更敏感的 HS2H 细胞用于 PRRSV 分离。通常将感染猪及流产、死产胎儿的肺及其它组织匀浆接种新培养的原代 PAM 或其它传代细胞系, 经传代后出现特征 CPE (细胞圆缩、聚集和脱落) 者, 表明病毒分离呈阳性。

1.3 病毒的鉴定 不同分离株在细胞培养上生长繁殖情况各不相同。有些病毒株在第一代细胞培养 3~4 天即可出现 CPE, 但有些毒株则需在第三代才出现 CPE, 有些分离株在敏感细胞上并不出现细胞病变。电子显微镜负染观察可见 PRRSV 粒子呈球形, 直径 55~60 nm, 有囊膜, 表面有纤突。在进行

收稿日期: 2009-12-09

基金项目: 东莞市 2008 年专项经费项目 (2007108101100)

*: 通讯作者

病毒分离的同时,还应结合相应的间接荧光抗体试验 (IFA) 和免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA) 等方法进行鉴定。另外,还可用 RT-PCR 法扩增病毒抗原基因,作遗传基因鉴定,序列测定。基因组有 7 个 ORF,全长 15 101 nt,从而使结果更为可靠。

2 检测抗原的方法

2.1 免疫组化染色法 以蔗糖密度梯度离心法提纯的 PRRS 病毒 SC1 株作为抗原,免疫家兔制备兔抗 PRRS 病毒 IgG,张平英等^[3]成功建立了检测 PRRS 病毒抗原的间接免疫酶组织化学法。该方法只与 PRRS 病毒感染猪组织呈现阳性反应,与猪瘟病毒 (HCV)、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪乙脑病毒 (JEV) 人工感染并致死仔猪的肝脏组织呈现阴性反应。用该方法检测 PRRS SC 21 株人工感染 28 日龄仔猪,在感染后 7 d 即可在肺门淋巴结、胸腺、扁桃体、十二指肠、肺、大脑和肾脏检测到 PRRS 病毒抗原。该法具有特异、直观和敏感的特点,可用于 PRRS 病毒感染的实验室诊断、抗原定位及甲醛固定样本的回顾性诊断。

2.2 荧光抗体法 杨汉春等^[4]报道,应用 PRRSV 单克隆抗体,采用间接和直接荧光素 (异硫氰酸荧光黄 FITC) 标记抗体试验,对分离获得的 PRRSV 毒株进行血清型鉴定以及在感染的 MARC-145 细胞中的定位。彭长凌等^[5]报道,应用 PRRSV 保守的核衣壳蛋白 (N 蛋白) 的单克隆抗体为一抗,用荧光标记抗体法对 PRRSV 人工感染猪和 PRRSV 疑似猪的肺组织进行抗原检测,取得预期结果,提高了该方法检测结果的准确性和可靠性。

2.3 免疫过氧化物酶技术 采用针对 PRRSV N 蛋白的单克隆抗体 SDOW17 作为一抗,用生物素化马抗鼠 IgG 作为二抗,张晓梅等^[6]成功建立了辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素-生物素 (LSAB) 免疫组化染色检测 PRRSV 抗原。应用 LSAB 染色技术检测 12 头人工感染 PRRSV 美洲株或国内分离株的 SPF 仔猪组织细胞内的 PRRSV 抗原,阳性检出率为 100%。与间接荧光抗体试验相比,LSAB 免疫组化染色法阳性结果易判定,背景清晰,结果稳定,可反复阅片,且不需特殊仪器。与原位杂交相比,LSAB 染色法操作简单,重复性好,成本低廉。

2.4 原位杂交 李雪梅等^[7]报道,根据 GenBank 收录的美洲型 PRRSV VR22332 株 ORF6 和 ORF7 基因序列,设计并合成大小为 37 bp 的寡核苷酸探

针,经生物素标记后,成功建立了原位检测石蜡组织切片中 PRRSV 核酸的方法。该探针能检测到 56 pg PRRSV 核酸的 RT-PCR 产物 DNA,能特异检测出 PRRSV 核酸及其 PCR 产物,而对 HCV、PPV、PRV、JEV 的核酸呈阴性反应。应用该方法检测 PRRSV SC 21 株人工感染的 28 日龄仔猪,在感染后 7 d 即可在肺脏、肾脏、扁桃体、胸腺、肺门淋巴结、十二指肠和大脑检测到 PRRSV 核酸。该法可用于仔猪 PRRSV 感染的诊断和组织中核酸的定位及分布研究,也可用于甲醛固定组织的回顾性诊断。

2.5 RT-PCR Suarez 等^[8]1994 年建立了检测 PRRSV 的 RT-PCR 方法,该方法具有很高的特异性和敏感性。仇华吉等^[9]报道,根据美洲株 IAF-exp91 基因组 ORF7 序列设计了一对引物,用 RT-PCR 证实了国内 PRRSV 的早期分离株 CH-1a 的基因型为美洲型。李华等^[10]利用 RT-PCR 检测 PRRSV 持续性感染,较准确地反映了试验感染猪的病毒血症的发展状态,为采用合适的方法净化 PRRSV 在猪群中的持续性存在和传播提供了分子生物学依据。宋志军等^[11]报道建立了 PRRSV TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法,灵敏度比常规 RT-PCR 高 100 倍。目前,RT-PCR 方法已用于检测血清、精液及临床组织样品中的 PRRSV 核酸,在感染后 24 h 的血清样品中即可检出病毒核酸。

2.6 RT-LAMP 2007 年深圳检验检疫局^[12]完成“猪蓝耳病病毒 RT-LAMP 和压电免疫蛋白传感器快速新型技术研究”,研制的试剂盒具有简便、快速、准确、安全等特点,检测结果肉眼可判定,1 h 内获得检测结果。研究表明检测过程所需时间仅为常用方法的四分之一,且无需特殊设备,适合口岸、基层单位或野外快速检测。

2.7 基因芯片技术 高淑霞等^[13]将 PRRSV、HCV、PRV、PPV 和猪圆环病毒 2 型的保守序列构建重组质粒制备探针,并将各探针按一定的阵列点加到硝酸纤维素膜上加以固定,制备低密度基因芯片。与 RT-PCR 方法比较,显示了较高的敏感性。该方法的建立,为大批量快速诊断、普查猪病毒性繁殖障碍疾病提供了有效的鉴别诊断手段,但应用要求较高,实际应用于生产还需进一步降低成本。

3 检测抗体的方法

3.1 间接免疫荧光抗体试验 (IFA) 间接免疫荧光抗体试验特异性较高,可以确定抗体的滴度,动物感

染后 2~3 个月检测结果可靠。张鹤晓等^[14]应用 IFA 对北京地区的 3 个发病猪场进行检测, 42 份猪血清中 21 份阳性, 结果提示北京地区存在 PRRS。孙颖杰等^[15]用 96 孔微量板作为载体, 建立了检测 PRRS 抗体的微量 IFA 与传统的玻片 IFA 比较, 不仅特异性与敏感性相同, 而且降低了试验成本, 减化了制备程序。

3.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA) Wensvoort 等^[2]建立了 PRRSV 血清抗体的免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA) 检测方法。IPMA 具备高特异性和敏感性, 经常用于感染后 7~15 天检测, 至今仍是欧美国家广泛使用的血清学诊断方法。王刚等^[16]首次在国内成功建立了 IPMA 检测 PRRS 抗体的方法, 具有较高的敏感性和特异性。

3.3 血清中和试验 (SN) 血清中和试验特异性好, 但敏感性低, 不适用于早期诊断。Yoon 等^[17]建立了改良血清中和试验方法, 通过在病毒稀释液中添加 20% 新鲜猪血清, 同时使用 MARC-145 细胞增殖病毒。经鼻内接种 PRRSV 的 8 周龄 SPF 猪感染后 9~11 天, 即可检出较高滴度的中和抗体, 并可自始至终获得较高的中和抗体效价。

3.4 乳胶凝集试验 (LAT) 王忠等^[18]利用纯化的 PRRS 病毒重组 M 蛋白致敏乳胶制成乳胶抗原, 成功地建立了一种检测 PRRS 病毒血清抗体的乳胶凝集试验 (LAT) 诊断方法。用制备的乳胶 M 抗原分别检测猪瘟、猪伪狂犬病、猪细小病毒病、猪弓形体病、猪衣原体病、猪乙型脑炎阳性血清, 结果均为阴性, 无交叉反应, 说明建立的 LAT 方法具有良好的特异性。用建立的乳胶凝集试验方法与国外 IDEXX 公司 PRRS 病毒抗体检测试剂盒同时对 76 份猪血清样本进行检测, 结果表明建立的 LAT 方法的特异性和敏感性均为 95%, 两种方法的总符合率为 87%, 检出率基本一致。研究结果表明 LAT 方法具有操作简便、快速、敏感性高、特异性强、价格低廉且可用于现场检测等优点, 是一种适合基层兽医单位用于 PRRS 病毒血清抗体检测的新方法。

3.5 免疫胶体金技术 李军等^[19]用胶体金标记提纯后的兔抗 PRRSV IgG, 建立了一种以微孔滤膜为固相载体, 以红色胶体金为标记物的检测 PRRSV 的斑点免疫金渗滤法 (DIGFA)。特异性阻断试验与交叉试验证明 DIGFA 检测 PRRSV 有较高的

特异性。检测 15 份临床样本, 其中 3 份 GIGCA 及细胞培养均为阳性, 电镜观察亦可见符合 PRRSV 特征的病毒粒子。方莹等^[20]2004 年应用酶联免疫吸附原理和胶体金层析技术, 在作玻璃纤维和硝酸纤维素膜的检测线和对照线上分别喷上胶体金 PRRSV, PRRSV 和兔抗 PRRSV 抗体, 成功研制出 PRRSV 抗体免疫金标快速诊断试纸。该试纸对样品进行 PRRSV 抗体的检测结果与 PRRS-ELISA 试剂盒的相一致, 是一种微量控制、操作简便、特异性好的新检测方法。

3.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) Albina 等^[21]用 PRRSV 接种 PAM 培养, 制备阳性抗原, 并用相同的方法制备模拟抗原, 首次建立了检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA。随后, Takikawa 等建立了以 MARC-145 制备抗原检测 PRRSV 抗体的 ELISA。随着研究的不断深入, ELISA 方法也不断得以改进, 非特异性逐渐消除, 敏感性进一步增加。目前英国已把 ELISA 作为诊断的常规手段。在国内, 也建立了不少的 ELISA 诊断方法, 普遍采用 MARC-145 来制备全病毒抗原且运用多种 ELISA 方法。马志永等^[22]用 PRRSV 弱毒株 (美洲株) 在 MARC-145 细胞上增殖收获后, 3 000 r/min 离心 10 min, 去掉细胞碎片, 灭活后即成为包被用抗原, 以 NC 膜做载体, 成功地建立了 Dot-ELISA。

用 PRRSV 全病毒包被酶标板, 生产厂商要求所用过的试剂盒材料必须焚烧处理, 如果在操作或处理上出现失误, 这就存在着潜在散毒的危险。当前, 利用基因工程技术获取重组蛋白作为诊断用抗原可避免散毒^[23], 已成为血清学技术的发展方向。杜文金等^[24]以纯化的重组 N 蛋白作为包被抗原建立了检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 方法, 在免疫后 6 天就能检测出抗体, 比 IFA 敏感性好。顾小雪等^[25]利用 GST-GP5AB 重组蛋白作为包被抗原, 通过反应条件优化, 建立了用于检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA 方法。运用该方法对 PRRSV 疫苗免疫后不同时间的仔猪进行 PRRSV 抗体检测, 同时与重组 N 蛋白和 PRRSV 抗原 ELISA 的检测结果进行比较, 结果表明, 该方法与重组 N 蛋白和 PRRSV 抗原 ELISA 检测的结果基本一致。

M 蛋白是 PRRSV 的主要结构蛋白之一, 由 ORF6 基因编码, 大小约 19 kDa, 为非糖基化蛋白。北美洲和欧洲型分离株分别含有 174 和 173 个氨基酸。

M 蛋白是欧洲毒株结构蛋白中最为保守的蛋白,在北美洲株间也是高度保守的,具有很强的免疫原性,免疫印迹分析表明 M 蛋白可使感染后 10 天的猪产生可检测的抗体。因此可以用体外表达的重组 M 蛋白作为血清学试验的靶抗原。目前,国内外还没有将 M 蛋白进行表达研究并用于建立血清学诊断方法的报道,因此将 PRRSV 的 M 蛋白基因进行表达并将其作为靶抗原,以辣根过氧化物酶标记建立检测 PRRSV 的 PPA-M-ELISA 诊断方法值得研究。

4 小结

PRRS 的检测方法众多,各有其优缺点。检测 PRRSV 抗原的方法有病毒分离、免疫过氧化物酶染色和免疫荧光抗体染色等方法,但都需要细胞培养,工作量大,周期长,不利于基层推广应用。病毒分离是诊断该病最确切可靠的一种方法,但因上述缺点,此法多用于急性病例的确诊和新疫区的确定。血清学方法是目前广泛应用于实验室的诊断方法,其操作简单,敏感性和特异性都较高,在 PRRSV 的诊断中发挥着重要的作用。ELISA 因具有半自动化,经济实效且适于大批样品检测等优点,已用于许多畜禽传染病的诊断。随着分子生物学的发展,利用基因工程技术获得重组蛋白建立 EILSA 检测方法,成为血清学技术发展的新方向,具有更加广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M],北京:科学出版社,1997.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M, et al. Mystery swine disease in the Netherland: the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130.
- [3] 张平英,朱德康,程安春,等.间接免疫酶组织化学法检测猪繁殖与呼吸综合征病毒感染和抗原定位[J].*中国兽医学报*, 2008, 28(2): 128-132.
- [4] 杨汉春,黄芳芳,张旭,等.用单克隆抗体鉴定猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株[J].*中国兽医杂志*, 1997, 23(4): 3-5.
- [5] 彭长凌,高崧,刘秀梵.PRRSV 间接免疫荧光检测法的建立和应用[J].*中国兽医科技*, 2005, (4): 15-19.
- [6] 张晓梅,杨汉春,任慧,等.用 LSAB 免疫组化染色法检测猪生殖-呼吸道综合征病毒抗原的研究[J].*中国预防兽医学报*, 1999, (11): 427-429.
- [7] 李雪梅,程安春,汪铭书,等.寡核苷酸探针原位检测石蜡切片中 PRRSV 核酸[J].*中国兽医学报*, 2006, 26(4): 350-353.
- [8] Suarez, et al. Direct Detection of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus by Reverse Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) [J]. *Archives of Virology*, 1994, 135: 89-93.
- [9] 仇华吉,郭宝清,童光志,等.猪繁殖-呼吸道综合征病毒 (PRRSV) CH-1a 株基因型鉴定[J].*中国兽医学报*, 1998, (2): 15-18.
- [10] 李华,杨汉春,高云,等.反转录聚合酶链式反应检测猪繁殖与呼吸综合征持续性感染[J].*中国兽医杂志*, 2001, (1): 3-5.
- [11] 宋志军,宋长绪,杨增岐,等.猪生殖与呼吸综合征病毒 Taq-Man 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].*中国兽医科学*, 2006, (2): 17-21.
- [12] 两重大动物疫病快速检测方法通过鉴定[OL]. http://bgt.aqsiq.gov.cn/tpxw/ywbd/200711/t20071107_52244.htm.
- [13] 高淑霞,吴时友,庄文忠,等.猪病毒性繁殖障碍病低密度基因芯片诊断方法的建立[J].*西北农业学报*, 2006, (4): 45-48.
- [14] 张鹤晓,王刚,王彩兰,等.应用间接免疫荧光试验从猪群中检测出 PRRS 抗体[J].*中国兽医杂志*, 1996, (11): 7-8.
- [15] 孙颖杰,孙延峰,潘凤城,等.用微量 IFA 法检测猪繁殖呼吸综合征[J].*中国动物检疫*, 1997, (5): 9-12.
- [16] 王刚,张鹤晓,甘孟侯,等. IPMA 检测猪生殖和呼吸综合征病毒抗体的研究[J].*中国兽医杂志*, 1996, (12): 3-5.
- [17] Yoon I J, Joo H S, GOVAL S M, et al. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6(3): 289-292.
- [18] 王忠,杨汉春,郭鑫,等.重组 M 蛋白-乳胶凝集试验检测 PRRS 病毒血清抗体的研究[J].*中国兽医杂志*, 2002, 38(7): 11-13.
- [19] 李军,林继煌,姜平,等.用免疫金技术检测猪繁殖与呼吸综合征病毒[J].*畜牧与兽医*, 2001, 33(2): 1-2.
- [20] 方莹,黄印尧,张长弓,等.猪繁殖与呼吸综合征 PRRSV 抗体免疫金标快速测试纸的研制与应用[J].*福建畜牧兽医*, 2004, 26(2): 1-2.
- [21] Albina E, Leforban Y, Baron T, et al. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Ann Rech Vet*, 1992, 23(3): 167-176.
- [22] 马志永,简中友,姜平,等.斑点酶联免疫吸附试验检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体方法的建立[J].*中国兽医科技*, 1997, 27(4): 3-5.
- [23] Helena Denal, Christian Meser, Jon Duri Tratschin, et al. An indirect ELISA for the antibodies against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen[J]. *J Virol Methods*, 1997, 65(2): 169-181.
- [24] 杜文金,刘卫,王志亮,等.用重组核衣壳蛋白 ELISA 检测 PRRSV 抗体的研究[J].*中国动物检疫*, 2000, 17(5): 27-28.
- [25] 顾小雪,姜平,韩妍妍,等.重组 GP5 AB 蛋白间接 ELISA 检测 PRRSV 抗体方法的研究[J].*畜牧与兽医*, 2007, 39(2): 1-5.

动物专用大环内酯类新药——泰拉霉素

亢继俊, 王丽霞, 曾振灵

(华南农业大学兽医学院 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 泰拉霉素是动物专用的新型大环内酯类抗生素, 国内已批准用于猪呼吸系统疾病的防治。泰拉霉素的药动学特性优良, 吸收快, 达峰时间短, 生物利用度高, 在肺中可达到很高的组织浓度, 消除半衰期长, 药效持久。单次肌注或皮下给药即能提供全程的治疗, 在兽医临床具有广阔的应用前景。本文综述了泰拉霉素的理化性质、作用机理、抗菌活性、药动学、药效学、不良反应及残留, 为该药在兽医临床的应用提供参考资料。

关键词: 泰拉霉素; 抗菌活性; 药动学; 药效学; 应用

中图分类号: S853.76

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0007-04

A new macrolide antibiotic tulathromycin for animals

Kang Jijun, Wang Lixia, Zeng Zhenling

(College of Veterinary Medicine, Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Tulathromycin is a novel macrolide antibiotic for animals which has been approved for use in the prevention and treatment of swine respiratory disease in China. The antibiotic has good pharmacokinetic characteristic. It can be absorbed quickly, reach the C_{max} quickly and be eliminated slowly. Moreover, it can maintain a high concentration in animals' lungs and can provide a full-course therapy after a single dose (im or sc). Tulathromycin could be used extensively in veterinary clinic. Physico-chemical property, action mechanism, antibacterial activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics, residue and adverse reaction of tulathromycin were talked in this paper. It will provide information for reasonable application of tulathromycin in veterinary clinic.

Key words: Tulathromycin; antibacterial activity; pharmacokinetics; pharmacodynamics; application

泰拉霉素(tulathromycin), 又称土拉霉素、托拉菌素, 商品名为瑞可新(Draxxin), 是由美国辉瑞动物保健公司开发的最新的动物专用的大环内酯类半合成抗生素。2004年在欧盟和美国上市。用于牛和猪的由敏感菌引起的呼吸系统感染性疾病及由牛莫拉氏菌引起牛传染性角膜结膜炎的防治。泰拉霉素单次给药可提供全程的治疗。猪一般采用肌肉注射给药, 牛采用颈部皮下注射。

泰拉霉素分子式为 $C_{41}H_{79}N_3O_{12}$, 分子量为 806.08, 密度为 1.17, 是由 15 员氮杂内酯环(图 1A) 和 13 员氮杂内酯环(图 1B) 2 种同分异构体以 9:1 的比例组成的混合物。其溶液因结构中含 3 个的氨基基团而呈碱性, 两种同分异构体可通过 C_{11} 和 C_{13} 之

间内酯键的形成和断裂进行转换^[1]。

1 抗菌活性

泰拉霉素是广谱抗菌药, 对一些革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均有抗菌活性, 对引起猪呼吸系统疾病的病原菌尤其敏感, 如溶血性巴氏杆菌、出血败血性巴氏杆菌、睡眠嗜血杆菌、支原体、类胸膜肺炎的放线杆菌、支气管败血波氏杆菌、副猪嗜血杆菌等。辉瑞公司的实验证明, 泰拉霉素对引起牛传染性角膜结膜炎的牛莫拉氏菌也具有很好的抗菌活性^[2]。Sahin 等^[3]的实验表明, 引发羊流产的空肠弯曲杆菌 97% 对泰拉霉素敏感。Godinho 等^[4]采用肉汤微稀释法对从欧洲国家 2004-2006 年分离出的 170 株牛的呼吸系统病原菌和 133 株

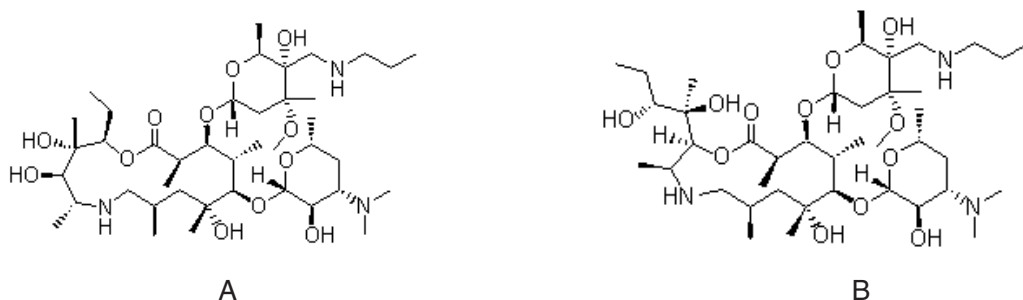


图1 泰拉霉素的化学结构

猪的呼吸系统病原菌进行了泰拉霉素的体外抗菌活性测定,结果见表1。辉瑞公司测定了泰拉霉素对2004年从美国分离的55株牛莫拉菌的抗菌活性, MIC_{50} 和 MIC_{90} 都为 $0.5\mu\text{g/mL}$, MIC 范围为 $0.25\sim 1\mu\text{g/mL}$ ^[2]。

泰拉霉素的体外抗菌活性受pH值影响较大。由于其具有三个碱性氨基基团,所以在不同的pH值条件下可形成不同带电形式($0, 1^+, 2^+, 3^+$),电荷量对于细菌脂质的溶解度破坏和穿过革兰氏阴性菌复杂的外膜是重要的,所以把培养基的pH控制在 $7.2\sim 7.4$ 是获得稳定的最小抑菌浓度一个关键因素。另外,不同批次的培养基以及是否存在血浆也对 MIC 值有很大影响。有血浆存在,需氧菌的 MIC 的范围和 MIC_{90} 值可减少至少4倍,需要复杂营养的细菌减少 $6\sim 10$ 倍^[4]。

泰拉霉素与其他大环内酯类的作用机理相同,能与敏感菌的核蛋白体50s亚基结合,使肽链的合成和延长受阻,影响细菌蛋白质合成。

2 药动学

2.1 吸收与分布 泰拉霉素在消化道的吸收率

很低,肌肉、皮下注射吸收迅速,达峰时间短,生物利用度高。由于其为有机碱,脂溶性较高,因此在动物体内分布广泛。Benchaoui等^[1]报道,猪按 2.5mg/kg 体重肌注后,达峰时间为 15min ,峰浓度为 616ng/mL ,稳态表观分布容积为 13.2L/kg ,绝对生物利用度大于 87% 。Nowakowski等^[5]报道,牛按 2.5mg/kg 体重皮下注射后, 15min 后血药浓度达峰值,表观分布容积为 11L/kg ,相对生物利用度超过 90% 。Eberhard Scheuch等^[6]报道,驹按 2.5mg/kg 体重肌注后,达峰时间为 $3.89\pm 3.85\text{h}$,峰浓度为 $410\pm 192\text{ng/mL}$,表观分布容积为 $15.2\pm 2.5\text{L/kg}$ 。

泰拉霉素对肺有特别的亲和力。辉瑞公司证明,泰拉霉素从注射部位吸收后,随着其在肺巨噬细胞和中性粒细胞中的迅速集聚而缓慢释放,因此在各组织中,肺的药物浓度最高而且持久。肌注及皮下注射给药后 24h ,猪和牛肺组织分别达到峰浓度 3470ng/g 和 4100ng/g ,肺组织药时曲线下面积AUC分别是血浆中的 61.4 倍和 73.7 倍。

2.2 代谢与排泄 EMEA(2004)以放射标记的

表1 泰拉霉素对猪和牛呼吸系统病原菌的体外抗菌活性

单位: $\mu\text{g/mL}$

动物	细菌(菌株数)	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC 范围
牛	溶血性曼氏杆菌(33)	1	2	$0.25\sim 4$
	出血败血性巴氏杆菌(44)	1	1	$0.25\sim 2$
	嗜组织菌(30)	2	4	$1\sim 4$
	支原体(63)	4	>64	$0.125\sim >64$
猪	胸膜肺炎放线杆菌(53)	16	16	$8\sim 32$
	出血败血性巴氏杆菌(53)	1	1	$0.25\sim 2$
	肺炎支原体(27)	0.03	0.06	$\leq 0.004\sim 0.125$

泰拉霉素进行了其在鼠、狗、牛、猪的体内研究^[7]。结果表明,泰拉霉素在这4种动物体内代谢方式相似,大部分以原药排出,很少一部分(不超过10%)在排泄物和组织样品中通过如下方式代谢:泰拉霉素分子脱氧糖胺部分发生N-去甲基、N-氧化、二脱氧甲基己糖部分裂解、二脱氧甲基己糖N-脱丙基、大环的酯水解作用。

泰拉霉素在猪和牛体内的血浆消除半衰期较长,分别为75.6 h和66 h,在肺中的消除半衰期分别长达6 d和8.75 d^[1,5]。用放射性标记的泰拉霉素测定其排泄过程^[7],结果显示,猪经过23 d,约2/3的药物从粪便排出,1/3从尿液排出。泰拉霉素在牛体内代谢较慢,47 d时,约72%的药物排泄,其中粪便32%,尿40%。

3 药效学

关于泰拉霉素治疗猪、牛的呼吸系统疾病的疗效,国外有大量报道。Nutsch等^[8]比较了用泰拉霉素(2.5 mg/kg 单剂量肌肉注射)和头孢噻吩(每天3 mg/kg 连用3 d)治疗720头自然感染呼吸系统疾病猪的效果,治愈率分别为71.1%和63.1%,死亡率明显低于对照组。Robb等^[9]报道了泰拉霉素(2.4 mg/kg 皮下注射)和恩诺沙星(12.5 mg/kg 肌注)治疗自然感染的牛呼吸系统疾病的疗效,治愈率分别为87.9%和80%。而且,泰拉霉素组比恩诺沙星组的日增重高,需要的后继治疗较少。Rooney等^[10]比较了泰拉霉素、替米考星和氟苯尼考对高危的牛的呼吸系统疾病的预防效果,结果显示,泰拉霉素用药组有明显低的发病率,能更好地预防牛呼吸系统疾病。

Lane等报道了按2.5 mg/kg 皮下注射泰拉霉素治疗人工感染牛莫拉菌的传染性角膜炎的疗效^[11]。泰拉霉素消除溃疡的中值时间为9.1 d,而生理盐水对照组在实验结束(21 d)时,仍有50%以上的牛有溃疡。结果表明,泰拉霉素作为一种单剂量注射液是治疗牛传染性角膜炎的有效选择。

Venner等^[12]评估了泰拉霉素治疗马红球菌和链球菌性驹肺脓肿的疗效。37匹用泰拉霉素(每周肌注2.5 mg/kg 一次)、33匹用阿奇霉素和利福平的组合(前7天每天按10 mg/kg 内服给药一次阿奇霉素,然后隔一天内服给药一次阿奇霉素并每天两次内服利福平,每次10 mg/kg)进行

治疗。结果显示,泰拉霉素需要53 d才能将肺脓肿完全消除,而阿奇霉素/利福平组需要42 d。但连续治疗4周后,无论在脓肿数量的减少或脓肿直径的减小上,泰拉霉素的疗效明显优于阿奇霉素/利福平组合。

4 不良反应与残留

4.1 不良反应 泰拉霉素的急性毒性作用较低^[7],以100、300、1 000 mg/kg 体重的剂量给狗口服,未见死亡现象,仅个别有呕吐反应。以100、300、1 000、2 000 mg/kg 体重的剂量给小鼠口服,无死亡数,血和尿常规检测参数在1 000和2 000 mg/kg 时有所变化。静脉注射时,犬和鼠的最大无致死量为10 mg/kg 体重。兔的急性经皮(肤)毒性实验显示,将泰拉霉素按2 000 mg/kg 体重涂在皮肤上24 h后,兔的皮肤稍有肿胀,有轻微的脱落,食欲和排便量减少。以15、50、100 mg/kg 体重给小鼠口服,未产生一般生殖毒性;以15、100、200 mg/kg 体重给小鼠口服的研究结果表明,在15 mg/kg 体重时,泰拉霉素无致畸或胚胎毒性;用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)进行致突变研究,结果也为阴性。

据报道^[12~14],以2.5 mg/kg 体重剂量给猪、牛、驹、羊注射给药后,注射部位都会出现肿胀及皮下组织变色等反应。猪和牛暂时出现多涎现象,但很快消失。加大剂量给药时,动物出现明显的疼痛征兆,以7.5 mg/kg、12.5 mg/kg 体重剂量分别给牛颈部皮下注射、给猪腿部肌肉注射给药后,牛出现明显的摇头现象,猪出现呻吟及跛行现象。泰拉霉素可能产生心脏毒性,以12.5 mg/kg 和15 mg/kg 体重剂量分别给6头牛皮下注射后,两组中分别有1头和2头发生心肌变性。Monica Venner等^[12]观察到,在279头驹中按2.5 mg/kg 体重剂量肌注泰拉霉素,有11头有轻微的腹泻,6头体温升高,12头注射部位肿胀。

4.2 残留 国外进行了泰拉霉素在猪、牛的肝、肾、肌肉等可食性组织的残留研究^[14]。结果表明,泰拉霉素在猪和牛的肝、肾和注射部位残留浓度最高,而且各组织的残留分布及残留标识物和总残留的比值一般是恒定的。FDA规定,牛和猪的休药期分别为18 d和5 d,可食性组织残留检测的靶组织分别为肝和肾。泰拉霉素在猪和牛可食性

组织的最大残留限量(MRLs)见表2。一般情况下,按合理的给药方案,经过休药期后,各种组织器官的残留量均低于规定标准。泰拉霉素的检测方法有放射性标记测定法和 HPLC-MS-MS 法,以后者较为常用。

表 2 泰拉霉素在猪牛可食性组织的 MRLs

动物	靶组织	MRLs (μ g/kg)
猪	脂肪	100
	肝脏	3000
	肾脏	3000
牛	皮肤+脂肪	100
	肝脏	3000
	肾脏	3000

5 结语

泰拉霉素对于牛、猪的呼吸道疾病及由牛莫拉氏菌引起的传染性角膜结膜炎具有十分明显的治疗效果。目前,泰拉霉素刚刚在我国上市,因此拥有良好的开发应用价值。在我国,大环内酯类药物现使用较为广泛的是泰乐菌素和替米考星,这两种药物的使用虽然都取得了良好的效果,但随着使用时间的延长,在很多地区出现了不同程度的耐药性,而且这两种药通常采用拌料或饮水给药方式,一般需要多次重复给药才能发挥药效^[15]。泰拉霉素药效均强于泰乐菌素、替米考星,而且具备优于其它大环内酯类抗生素的动物专用、用量少、一次给药、生物利用度高、超长的消除半衰期、低残留等众多优点,它的应用必将得到进一步的扩展。

参考文献:

- [1] Benchaoui H A, Nowakowski M, Sherington J, et al. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine [J]. *Veterinary Pharmacol and Therapeutics*[J]. 2004, 27(4):203-210.
- [2] FDA. Freedom of Information Summary NADA141-244[Z]. Date of Approval: December 28, 2007.
- [3] Orhan Sahin, Paul J. Plummer, et al. Emergence of a Tetracycline-resistant *Campylobacter jejuni* Clone Associated with Outbreaks of Ovine Abortion in the United States[J]. *Journal of clinical Microbiology*. 2008, 46(5):1663-1671.
- [4] Godinho K S. Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative Breakpoints and susceptibility of field isolates[J]. *Veterinary Microbiology*. 2008, 129(3-4):426-432.
- [5] Nowakowski, Inskeep, et al. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new triam- ilide antibiotic, in cattle[J]. *Veterinary Therap- eutics*, 2004, 5(1):60-74.
- [6] Eberhard Scheuch, Janina Spieker, Monica Venner, et al. Quantitative determination of the macrolide antibi- otic tulathromycin in plasma and bronchoalveolar cells of foals using tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 850:464-470.
- [7] Committee for Veterinary Medicinal Products Tulath- romycin, Summary Report(2). European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections[Z]. EMEA/MRL/ 894/04-Final. 2004.
- [8] Nutsch R G, Hart F J, Rooney K A. Efficacy of tulath- romycin injectable solution for the treatment of naturally occurring Swine respiratory disease [J]. *Veterinary Therapeutics*. 2005, 6(2):214-24.
- [9] Robb E J, Tucker C M, Corley L, et al. Efficacy of tulathromycin or enrofloxacin for initial treatment of naturally occurring bovine respiratory disease in feeder calves[J]. *Veterinary Therapeutics*. 2007, 8(2):127-135.
- [10] Rooney K A, Nutsch R G, Skogerboe T L, et al. Efficacy of tulathromycin compared with bovine respiratory disease[J]. *Veterinary Therapeutics*, 2005, 6(2):154-166.
- [11] Lane V M, George L W, Cleaver D M, et al. Efficacy of tulathromycin for treatment of cattle with acute ocular *Moraxella bovis* infections[J]. *American Veterinary Medical Association*, 2006, 229(4):557-561.
- [12] Monica Venner, Regina Kerth, Erich Klug, et al. Evalua- tion of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals[J]. *The Veterinary Journal*, 2006, 174:418-421
- [13] Washburn K E, Bissett W, Fajt V, et al. The safety of tulathromycin administration in goats[J]. *Veter- inary pharmacology and therapeutics*, 2007, 30(3): 267-270.
- [14] FDA. Freedom of Information Summary NADA 141-244 [Z]. Date of Approval: May 24, 2005.
- [15] 宋福杰, 刘明春, 邹美. 兽用抗菌药物土拉霉素研究进展 [J]. *兽药与饲料添加剂*, 2006, 11(4):4-6.

固体分散体在兽药制剂开发中的应用

梁志凌, 马江耀

(广东省农业科学院兽医研究所, 广东省前沿动物保健有限公司研发中心, 广东 广州 510640)

摘要: 固体分散体在医药制剂工业中日益广泛的应用, 为兽药制剂开发提供了借鉴。本文就固体分散体的特点、载体的分类、制备方法作了概述, 并分析了固体分散体应用存在的问题, 展望了其应用前景。

关键词: 固体分散体; 应用

中图分类号: S853.99

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0011-03

随着我国畜牧业的高速发展, 兽药行业得到了全面的发展, 兽药的研究和生产取得了令人瞩目的进展, 兽药市场空前繁荣。兽药制剂在继承传统剂型的基础上进行创新, 相继开发出较新剂型的产品, 由以往的一种原料只做成单一的制剂逐步发展成一种原料药做成多种制剂。在考虑药物有效性的同时也考虑给药的方便性, 已经成为兽药行业的共识。兽药制剂技术和制剂工艺的研究正不断深入, 新的制剂技术在兽药生产中的应用不断扩大。

固体分散体是医药制剂工业近几十年来发展起来的技术, 这项技术已成功应用于改善难溶性药物的溶解性能, 加快溶出速度, 提高生物利用度, 但这项技术在兽药行业的潜在前景直至现在还未被完全认识到。

1 固体分散体的概念

1961年Sekiguchi首次提出固体分散体的概念^[1], 并采用固体分散技术将难溶性药物与水溶性载体制成固体分散体, 大大改善了难溶性药物的溶出。固体分散体并不是一种剂型, 而是制剂制备中所应用的一种分散技术。具体来说, 是指利用一定的方法使固态或液态药物高度分散在固体载体中所形成的一种均匀固体物。这种固体物可进一步制成各种剂型的制剂, 如粉剂、颗粒剂、预混剂、片剂、胶囊剂、栓剂、软膏以及注射剂等。通常药物以分子、胶态、微晶或无定形状态分散在水溶性、水不溶性或肠溶性载体材料中。药物可以是固态, 也可以是液态; 可以是化学药, 也可以是中药提取物^[2]。

2 固体分散体的特点及应用

固体分散体的主要特点是: 药物高度分散在固

体载体中, 药物的分散程度和溶出速率很大程度上决定于载体的性质, 因此, 可利用不同性质的载体制备固体分散体, 以达到不同要求的用药目的。

2.1 对于难溶性药物, 其生物利用度常常取决于制剂中固体药物的溶出速率, 以一般混合方法制得的粗分散状态的粉末因溶出速率低, 往往生物利用度也低。如果采用固体分散体, 使药物高度分散在水溶性载体中, 则大大改善了药物在动物体内的溶出与吸收, 从而提高药物的生物利用度, 制备出高效、速效的兽药制剂。利用水溶性载体也可以增加难溶性药物的溶解度, 使难溶性药物制成可溶性粉剂成为可能。这在使一些难溶性药物适应畜禽给药方式, 特别是拌料给药、饮水给药方面的意义非同小可。如妥曲珠利固体分散物^[3]、氟苯尼考可溶性粉^[4]等。

2.2 如果用难溶性载体制备固体分散体, 则可制成长效制剂, 达到缓释效果, 延长药物作用的时间。

2.3 如用肠溶性载体可控制药物在肠中释放, 起到定位给药的作用。

2.4 利用载体的包被作用, 掩盖药物的不良气味和口味, 改善制剂拌料时的适口性。

2.5 利用载体的包埋、吸附作用将易挥发、易分解及易氧化的药物制成固体分散体, 增加药物的稳定性。尤适用于饲料药物添加剂。

2.6 利用载体使液态药物固体化, 方便应用(如鱼肝油、维生素A、E、D等)。

3 固体分散体载体的分类

制备固体分散体的载体应具物理、化学和热稳定性, 熔点低; 不与药物发生化学反应, 也不影响药

物的稳定性;对药物具有很强的分散能力并能持久地保持此分散状态;无毒副作用,无不利的生理活性;不影响药物的药效与含量测定;价廉、易得。常用的有水溶性、水不溶性和肠溶性三大类。

3.1 水溶性载体

3.1.1 高分子聚合物 最常用的是聚乙二醇(PEG)类,一般选用分子量在1 000~20 000的作为固体分散体的载体,其中PEG4000和PEG6000最为常用^[5],适用于熔融法制备固体分散体;聚乙烯吡咯烷酮(PVP)类,常用规格有PVP_{K15}、PVP_{K60}、PVP_{K90},适用于溶剂法、研磨法制备固体分散体,但PVP易吸湿,制得的成品湿稳定性差,且价格较贵。

3.1.2 表面活性剂类 聚氧乙烯和聚氧丙烯共聚物泊洛沙姆,增加药物溶出的效果明显大于PEG类,是较理想的速释固体分散体载体^[6]。可用熔融法或溶剂法制备固体分散体。价格较贵。

3.1.3 有机酸类 枸橼酸、富马酸、琥珀酸、胆酸等,多与药物形成低共熔混合物,适用熔融法制备固体分散体,但不适用于对酸敏感的药物。

3.1.4 糖类与醇类 糖类有右旋糖酐、半乳糖和蔗糖等,醇类有甘露醇、山梨醇、木糖醇等。它们的特点是水溶性强,适用于剂量小、熔点高的药物,应用时大多配合PEG类高分子聚合物作联合载体。

3.2 水不溶性载体

3.2.1 纤维素类 如乙基纤维素,无毒、无药理活性,是一种理想的水不溶性载体材料。其特点是能溶于多种有机溶剂中,黏度较大,能较好地抑制药物结晶生长;载药量大,不易老化,广泛应用于缓释固体分散体。多采用溶剂法制备固体分散体,可加入水溶性材料如HPC(羟丙基纤维素)、HPMC(羟丙基甲基纤维素)、PEG、PVP等调节释药速率,也可加入表面活性剂如月桂醇硫酸钠增加载体的润湿性,调节药物释放速度。

3.2.2 聚丙烯树脂类 此类产品在胃液中可溶胀,而在肠液中不溶,是广泛应用于制备缓释固体分散体的材料。多适用溶剂法制备固体分散体,如加入适量水溶性载体PEG或PVP等还可调节释药速率。国外商品名为Eudragit E、RL、RS等几种。

3.2.3 脂质类 胆固醇、棕榈酸甘油酯、蓖麻油蜡等,可用于制备缓释固体分散体,常采用熔融法制备。一般药物的溶出随脂质含量的增加而降低,通常加入适当的表面活性剂、糖类等水溶性材料调节释药速度。

3.3 肠溶性载体 主要有纤维素类,如醋酸纤维素酞酸酯(CAP)、羟丙甲纤维素酞酸酯(HPMCP)等;聚丙烯酸树脂类,如国产II号和III号,相当于国外商品名Eudragit L和Eudragit S。这种载体在胃酸条件下不溶,到肠液环境下才开始溶解,适用于在胃中易分解失效、对胃刺激性大,或要求在肠内定位释放的药物。

可根据要求选择适宜的载体,也可几种载体联合应用。

4 固体分散体常用的制备方法

4.1 熔融法 将药物与载体混匀,加热至熔融,在剧烈搅拌下将熔融物迅速冷却成固体,将此固体在适当温度下放置,使其变脆而易粉碎。放置温度视不同品种而定。该方法的关键在于熔融物必须迅速冷却固化,以保证药物的高度过饱和状态,并防止某些药物立即析出结晶,这样就能得到高度分散的固体分散体。实际操作中可将熔融物倾倒在冷却的不锈钢板上,使之成薄层,钢板下吹以冷风或用冰骤冷,使之迅速冷却固化,形成低共熔固体分散物。本法适用于对热稳定的药物,多采用熔点低,不溶于有机溶剂的载体材料如PEG、糖类及有机酸等。

4.2 溶剂法 也称共沉淀法或共蒸发法。将药物与载体共同溶解在有机溶剂中,蒸发除去溶剂后,药物与载体同时析出,干燥后即得共沉淀物固体分散体。常用的溶剂有氯仿、乙醇、丙酮等。本法适用于对热不稳定或易挥发的药物。多采用既能溶于水、又能溶于有机溶剂、熔点高、对热不稳定的载体材料如PVP、半乳糖、甘露醇等。

4.3 溶剂-熔融法 将药物先溶解于少量有机溶剂中,再将此溶液直接加入已熔融的载体材料中混合均匀,蒸发除去溶剂,按熔融法冷却固化得到固体分散体。本法适用于液态药物或小剂量药物。凡适用于熔融法的载体均可采用本法。

4.4 溶剂-喷雾(冷冻)干燥法 将药物与载体共溶于适当的溶剂中,然后喷雾干燥(或冷冻干燥),除尽溶剂即得。

4.5 研磨法 将药物与载体混合后,强力持久地研磨一定时间,借助机械力降低药物粒度,使药物与载体以氢键结合,形成固体分散体。此法劳动强度大,费时费力,仅适用于小剂量的药物。

在兽药制剂设计处方、制定工艺时可根据不同用药要求及具体的生产条件选择适宜的载体和

制备方法。

5 存在问题

固体分散体的主要缺点是药物的分散状态稳定性不高,久贮往往发生老化现象,这是限制其广泛应用的一个因素。老化与药物浓度、载体材料、分散技术、贮藏条件等诸多因素有关,其中载体材料是影响固体分散体稳定性的重要因素。如何选用载体,选用单一载体还是联合载体,比例多少,都需要实验数据来说明。

固体分散体应用于大规模生产也面临着严峻挑战。熔融法的冷却过程,实际生产时可能不容易实现。此外,冷却过程中固体分散体可能吸潮,所以制备过程应防潮。溶剂法要除去大量的有机溶剂,必须在一个安全的环境中进行,回收溶剂需要特定的生产设备,成本较高,很少兽药生产企业能够具备这样的生产条件。且溶剂法有时难以除净残留的溶剂,给制剂带来潜在的毒性。

溶剂-喷雾干燥法也许是一种适合大规模生产的制备固体分散体的方法。该法生产效率高,可连续生产,尤其适用于对热敏感的药物,稳定性好。兽药生产企业配备这种生产设备也容易实现,但工艺费时,成本稍高。

由于我国兽药行业自身的特点,兽药使用中价格问题突显其中,成本控制始终贯穿着兽药制剂开发的主线,很大程度上制约了制剂新技术、新工艺的应用。固体分散体所用的载体材料,大多比现在常用的兽药辅料价格高,无疑给产品增加了较大的成本,如何在合理的费用范围内寻找符合要求的载体或载体组合是每个研发者所必须思考的问题。

6 应用前景

随着兽医科技的突飞猛进,兽药制剂也要在改善用药质量、注重给药的方便性、保证动物用药安全有效上不断优化,以满足兽医临床用药需要。通过固体分散体将水溶性药物或难溶性药物开发成速释或缓释兽药产品,是一种值得研究发展的新途径。选择适当的载体及恰当的药物与载体比例,能够获得理想释药速率的固体分散体,再进一步制成不同的兽药制剂,这是一种简单、经济、有效的方法。尤其是开发通过饮水给药或伴料给药的制剂,固体分散体的优势是显而易见的。

尽管固体分散体在生产上还存在着诸多问题,但我们相信,其在开发兽药新剂型方面的潜力

不可低估。广大兽药研发工作者不应该止步不前,要在现有的基础上,针对不同动物种类疾病治疗的需要,大胆创新,开发出针对性强、给药方便的兽药制剂新剂型。

参考文献:

- [1] Sekiguchi K, Obi N. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man[J]. Chem Pharm Bull, 1961, 9(11): 866
- [2] 谢秀琼, 周淑芳, 韩丽. 现代中药制剂新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 156-157.
- [3] 祁雯雯, 李俊杰, 刘永琼, 等. 妥曲珠利固体分散物的制备[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(4): 34-37.
- [4] 刘永琼, 祝宏, 王尧, 等. 氟苯尼考可溶性粉的研制及溶出度测定[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(10): 8-12.
- [5] [英] R. C. 罗, [美] 舍斯基, [英] P. J. 韦勒. 药用辅料手册[M]. 第四版. 北京: 化学工业出版社, 2005, 523-529.
- [6] 谢秀琼, 周淑芳, 韩丽. 现代中药制剂新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 147.

·小知识· 兽药的剂量

给动物防病治病,使用药物必须认真计算剂量,也就是药的用量。不同的动物,不同的疾病,在疾病的不同发展阶段,用药的量是不同的。用药的量如果过低,不但不能收到预期的治疗后果,并且耽误了治病时机,使疾病得到进一步发展;药量用得太多,不仅耗费了过多的药费,并且可能发生不良作用,引起中毒,甚至危及动物生命。

总而言之,治病防病所用的药的剂量,必须恰当。为此,用药的人应该掌握药物剂量的种类这一基本知识,才能做好这一工作。

药物的剂量种类有以下几种:

1. **药物的最小有效剂量** 这是指使用的药物的剂量能够开始出现药效。这种剂量一般比较小,它仅仅开始发生对疾病的治疗作用,而未能达到充分的治疗疾病的效用。
2. **常用剂量** 这是指所使用的药物,已达到充分治疗疾病的剂量。常用剂量比最小有效剂量要高。
3. **极量** 是用药已达到最高的限量。使用药物一般不宜用极量,超过极量是很不安全的。
4. **最小中毒量** 这是指使用的药物,其用量已超过极量,达到动物已开始出现中毒的剂量。
5. **中毒量与致死量** 它的剂量比最小中毒量更高,足以使动物发生中毒与死亡。

从以上的用药剂量的种类来看,用药的安全范围是在最小有效剂量与极量之间。在兽医医疗实践上,给动物治病,用药的剂量应该在安全范围内选择,但一般不采用极量或最小有效剂量,而用常用剂量。

(信息来源: <http://www.chinabreed.com/>)

动物屏障系统的环境质量控制

曹君君

(汕头大学医学院实验动物中心, 广东 汕头 515041)

摘要: 硬件设施的高性能及良好维护是维持屏障环境各项参数达到标准的基础; 对进出屏障的人流和物流的严格控制是减少环境受外源微生物污染的关键; 对屏障环境的制度化监测和维护是保证环境质量达标的核心。

关键词: 屏障环境质量; 监测; 维护

中图分类号: R-332

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2010)02-0014-02

Regulation of environmental quality in barrier system of animals

Cao Jun Jun

(Laboratory Animal Center, College of Medicine, Shan Tou University Shantou 515041, China)

Abstract: Constant operation and qualified maintenance of facilities are the basis for barrier system to meet specific environmental standards. Strict regulation on circulation of workers and materials in barrier system is the key factor to reduce exogenous bacterial contamination. Conventional inspection and maintenance are the core to ensure qualified environment in barrier system.

Key words: Environmental quality of barrier system, supervision, maintenance

近年来,屏障系统在我国许多科研单位相继建成并投入运行,为我国的生物医药等领域的研究提供了重要的支撑条件。运行屏障系统核心意义之一就是要提供一个安全稳定的、可重复的实验环境,减少实验环境因素对实验结果的影响。国家标准^[1]对屏障环境风速(0.1~0.2 m/s)、温度(20~25℃)、湿度(40%~70%),照度(15~20 lx),压强梯度(20~50 Pa),菌落数(≤3),洁净度(10 000级)等的规定,使屏障系统环境控制得以量化。完善可靠的硬件设施、规范的人流与物流和制度性的环境监测与维护是动物屏障系统内环境质量达标的关键所在。本文结合本单位的实际运行情况对此作一总结。

1 良好的硬件设施

1.1 稳定的送风与排风系统 屏障系统运行后一般不能停止,送风机组和排风机组长期稳定运行是保证屏障环境温度、湿度、压差和洁净度等基本参数的先决条件。送风和排风机组要有可靠质量,同时对机组的监测与维护也是必须的。本单位除值班人员每天对机组运行察看并记录,还定期

邀请专业人员清理冷水塔,更换磨损器件,校正温度、湿度误差,检验备用机组的运行状态,维持了相关环境参数的稳定有效。另外,参考其它单位屏障系统经验^[2,3],根据本地实际情况,对送风系统的初效空气过滤膜每半个月更换一次,中效过滤每三个月更换一次,高效过滤每年更换一次。这不仅有效地控制了空气洁净度,也延缓了机组老化,减少机组事故率。总之,送风与排风系统高质量和规范维护是屏障环境稳定的基础。

1.2 安全的供水系统 供水系统是屏障环境控制的重要一环。饮水中虫卵、有害微生物和其它杂质会导致动物发病,并致裸鼠在实验过程中死亡。这些微生物随着动物粪便排出并附着在垫料灰尘中,对整个屏障系统的环境安全构成重大威胁。因此,饮水的充分消毒显得至关重要。本单位屏障用水先流经10 μm过滤棒、再经活性炭吸收杂质,后流入5 μm过滤棒,然后经臭氧消毒再进入水罐中,水罐中置浸入式紫外灯24 h照射消毒,最后流入供水管。为保证过滤和杀毒效果,每两周对水源中微生物检测一次并更换滤膜棒,每三个月更

换一次浸入式紫外灯,及时更换动物饮水瓶(1~2天更换一次)^[4]。运行两年以来,这些措施保证了各种实验动物正常生长,有效防止环境经水污染。

1.3 高效的消毒设施 进入屏障系统的物料如饲料、垫料、笼具和衣物等均需经高温高压消毒,稳定运行的高温消毒设备至关重要。本单位主要以高压炉作为主要消毒器具。为维持高压炉的稳定安全运行,设专人经专业培训后操作锅炉,每个季度请专业人员检修和保养,有效保证了锅炉运行状态。同时,每天早、中、晚自动定时紫外消毒洁净通道、更衣通道、污物通道和洗消间 30 min,以预防交叉污染。良好的消毒设施是屏障环境质量稳定的有力保证。

2 规范的人流与物流

2.1 人流 进入屏障系统的人如实验者、屏障系统管理者、饲养人员等是潜在的微生物传播载体,人员的不规范进出常常会导致屏障内微生物累积增多,增加屏障环境控制的难度。因此,严格的人员进入程序和实验室内规范的操作是每一位进入屏障系统人员必须遵循的准则。进入本单位屏障系统之前,须更换专用拖鞋后进入一更更衣再进入淋浴间淋浴,然后进入二更穿隔离服并佩戴口罩和手套,再进风淋室经风淋后方进入洁净通道,同时严格遵守单向行走的原则(从高压区向低压区),不交叉出入其它实验间。另外,每一个实验者都须先经过培训再进入屏障内,这是降低屏障环境受人为污染的有效方法。

2.2 物流

2.2.1 动物 动物是微生物最常见的载体。本屏障内许多动物从外地运入,有些从外国进口,经过长途运输和中转,动物可能成为微生物污染源。因此动物进入本屏障之前必须出具清楚的动物来源证明和质量证明,并保证外包装的密封完整。动物外包装先用 1% 的过氧乙酸喷雾消毒^[4],后放入传递窗并紫外照射 30 min 再移入笼盒。屏障工作人员必须每天巡查各个实验间,发现异常动物,及时隔离,做好处置记录,预防疾病的蔓延。

2.2.2 饲料和垫料 垫料和饲料均非洁净品,所有进入屏障的饲料和垫料都经过高压消毒。本屏障系统使用垫料为木屑。为减少木屑中的粉尘,先将木屑细筛,再分装成小袋,132℃ 高温消毒 30 min。每次消毒时均放置消毒测试卡以检验消毒效

果的可靠性。饲料先分装成小袋以确保高温蒸汽通过饲料表面。对饲料的消毒则以 121℃ 消毒 10 min,此方法在保证饲料消毒效果的同时有利于减少饲料营养成分因消毒带来的损失^[5]。

2.2.3 其它物品 笼盒、饮水瓶、瓶塞和隔离服等均先清洗干净并晾干后,再以 126℃ 消毒 30 min。其它物品如实验器械需要洗净后包双层布包再放入锅炉消毒。对于一些液体试剂无法高温消毒则用 75% 酒精擦拭外包装后,放入传递窗,经紫外照射 30 min 后取用。

3 制度化监测与维护

随着运行时间的增长,系统内环境的各种参数都会出现变化。制度化环境监测是发现问题、维持环境稳定的必要手段。本单位屏障系统每天检查一次各房间压差、温度、湿度及光照是否正常,并做好记录;用百毒杀消毒液擦拭地面和笼架。每周更换一次出风口过滤膜并监测尘埃粒子数,然后以百毒杀和二氧化氯消毒液交替使用,对所有空间进行喷雾消毒。每月检测一次压差表、温湿度表的准确性并进行校正,测量风速一次并对进风量做出相应调整。每两个月检测一次落菌数和光照度,记录结果和采取的措施。同时,及时更换屏障系统内损坏日光灯,每个季度检测一次光照度。这些监测和维护工作有利于及时发现本屏障中出现的问题,这对送风和排风机组的运行状态监测也有重要意义,也是维持屏障环境质量的核心理所在。

维持屏障环境稳定是一项系统工程,除硬件设施外,更需要实验人员和屏障管理人员自觉遵守相关程序,严格执行标准操作规程。因此,只有建立完善的、实践性强的标准操作规程,对进入人员实行严格的准入培训,制定合理的考核制度,才能确保屏障环境质量达标并维持稳定。

参考文献:

- [1] GB14925-2001. 实验动物环境及设施[S]. 北京, 2001.
- [2] 王永金, 雷培琪, 曾晓岚. SPF 级动物屏障系统的运营管理[J]. 四川生理科学杂志, 2008, 30(3): 122-123.
- [3] 顾美儿, 吴培林, 刘桂杰. 高校实验动物中心屏障系统的科学管理[J]. 实验技术与管理, 2008, 25(2): 168-170.
- [4] 张永斌, 郭学军, 邹移海, 等. 屏障系统管理模式的建立和应用[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2): 21-23.
- [5] 王刚, 潘甜美, 邹红霞, 等. 实验动物饲料灭菌方法比较[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4): 245-246.

陶赛特羊杂交改良本地羊的效果观察

李寿林, 仲万旭*

(互助县草原工作站, 青海 互助 810500)

摘要: 对50只陶本F1羊的生长发育指标进行了测定, 同时与同龄的本地羊进行比较。结果发现, 陶本F1羊4月龄和6月龄体重分别比同龄本地羊增加3.39 kg、4.45 kg ($P < 0.01$)。4月龄陶本F1羊的体高、胸围和体斜长分别比同龄本地羊提高5.72 cm、5.95 cm和7.63 cm。6月龄陶本F1羊分别比同龄羊提高5.87 cm、7.28 cm和7.80 cm ($P < 0.01$)。

关键词: 陶赛特羊; 本地羊; 杂交; 效果

中图分类号: S813.22 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0016-01

陶赛特羊原产澳大利亚和新西兰, 具有早熟、生长发育快、产肉性能高等特点, 是提高羊产肉性能的主要父本之一。互助县是青海地区绵羊的主产区, 但因当地绵羊品种个体小, 生长速度慢, 农户养殖效益甚微。互助县于2001年、2002年先后从新疆引进无角陶赛特种公羊24只, 用以杂交改良本地绵羊, 取得了显著成效。现将结果报告如下:

1 试验地点的自然概况

试验在青海省互助县东和乡李家庄村进行。试验区位于互助县东北部, 距县城20 km。地理位置为北纬 $36^{\circ}30' \sim 37^{\circ}09'$, 东经 $101^{\circ}46' \sim 102^{\circ}45'$ 。海拔高度2 650~3 256 m, 年均降水量600 mm以上。植被以禾本科为主, 属高寒草甸草场, 青草期为6~9月份。主要以放牧为主, 冬春补充饲草料。

2 试验材料和方法

2.1 试验羊群 父本为从新疆引进的1~3岁陶赛特公羊, 平均体重52.6 kg, 母本为互助县东和乡李家庄村饲养的健康适龄本地母羊, 平均体重22.6 kg。采用人工授精的方法配种。随机选择产羔时间相近, 健康无病的50只羔羊为试验组, 试验区农户自繁自养的本地羔羊50只为对照组。

2.2 饲养管理 试验组和对照组在相同的条件下饲养管理, 出生羔羊逐个佩戴耳号, 公母各半, 测定初生重, 公羊去势, 4月龄断奶后在夏秋牧场放牧, 防疫和驱虫随羊群常规进行。

2.3 试验方法 测定初生、4月龄和6月龄体重

(空腹称重)、体高(由鬐甲最高点至地面的垂直距离)、体斜长(由肩胛骨前端到坐骨结节后端的直线距离)和胸围(在肩胛骨后端绕胸一周的长度)。

2.4 数据统计分析 所测的各项指标均以 $X \pm SE$ 表示, 试验组与对照组羊各项指标的差异显著性, 用t检验统计分析。

3 结果与分析

3.1 体重 陶本F1羊4月龄、6月龄体重分别比同龄本地羊提高3.39 kg、4.45 kg, 差异均极显著($P < 0.01$)。详见表1。

表1 陶本F1羊与本地羊体重的比较

年龄	样本数(只)	陶本F1羊(kg)	本地羊(kg)
初生	50	3.78±1.09	2.67±0.98
4月龄	50	15.95±2.36	12.56±1.97
6月龄	50	18.84±3.87	14.39±3.95

3.2 体尺测定 4月龄陶本F1羊的体高、胸围和体斜长, 比同龄本地羊提高5.72 cm、5.95 cm和7.63 cm, 差异均极显著($P < 0.01$)。6月龄陶本F1羊的体高、胸围和体斜长, 比同龄本地羊提高5.87 cm、7.28 cm和7.80 cm, 差异均极显著($P < 0.01$)。详见表2。

4 讨论和体会

4.1 陶赛特羊具有生长发育快、肉用性能好的特点, 与本地羊杂交所产一代羊显示出一定杂交优势。在放牧饲养的条件下, 陶本F1羊不仅保持了母本耐粗饲的优点, 而且还弥补了母本生长速度

(下转第23页)

2010年上半年广东地区肉鸡行情分析

黎剑雄, 梁伯财, 张子聪

(广东温氏集团有限公司集团经营部, 广东 云浮 527439)

中图分类号: S8-1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0017-02

2009年,金融危机对经济实体的影响越来越明显,肉鸡养殖行业虽然没有经历大风波,但萧条的市场行情并没有给养鸡企业带来可观的利润,养鸡业在下半年亏损比较严重,年平均处于轻度亏损状态。2009年广东地区肉鸡消费与2008年相比有所减少,但减幅不大。肉鸡消费需求仍未回升,以出口外贸企业为主要经济支柱的东莞深圳地区受金融风暴影响较大,经济活动减少、消费人群流失,直接导致肉鸡消费需求减少。

从2009年底调查的全国各地种鸡存栏情况来看,土鸡种鸡存栏量减少较多,快大鸡种鸡存栏量稳中有减,整体种鸡存栏量有所减少,且大鸡行情低迷、饲料价格走高、投苗积极性较差等多个因素影响了种鸡企业的补栏积极性。预计2009年底至2010年第一季度,种鸡存栏数量、开产数量仍会维持在一个较低水平,第二季度开始有所回升。

预计2010年上半年肉鸡价格行情较2009年下半年理想,1月到2月中行情逐步向上,春节后会有小幅回落,第二季度会先上行后下走。从品种来看,预计快大类肉鸡价格稳中走弱,土鸡等高档鸡行情较好,竹丝鸡可能走出一路向下的困境。

1 2009年广东市场肉鸡行情走势回顾

回顾2009年广东市场肉鸡行情走势:见图1。春节后出现少有的利好行情,2月份一般是行情较差的月份,但广东行情总体较好。但市场低迷期提前出现,6月份肉鸡价格跌至低谷,比理论上价格最低的月份提前了一个月;节日消费拉动不明显,往年的一些传统节日,消费拉动期在3天前就已显现,并且出现量价齐升的喜人局面,但2009年的消费拉动期则滞后1~2天,销量虽然有所上升,但对价格的拉动显得极为乏力,甚至节前要下调价格才能拉升销量;节后萧条期延长,2009年节假日后的市场萧条期较往年有所延长,

一般节后4~5天市场得到恢复,但2009年的市场恢复期延长至一个星期甚至更长时间。

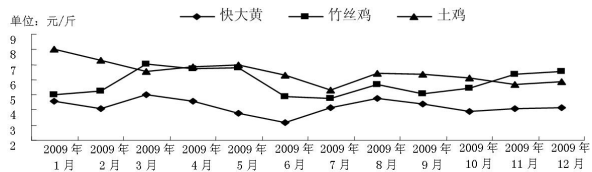


图1 2009年广东区域主要品种肉鸡肉价格走势

2 相关地区种鸡存栏变化情况

2.1 河南、广西地区种鸡存栏变化 近年来“南繁北养”的种鸡有所减少,河南当地养殖的青脚麻鸡等品种在种鸡存栏中所占比重增大,广东种鸡企业在河南饲养的种鸡仍有一定的存量,生产的快大类鸡苗对广东肉鸡市场还是有一定影响,但从抽样数据来看,河南种鸡存栏量一直在减少之中(见图2)。

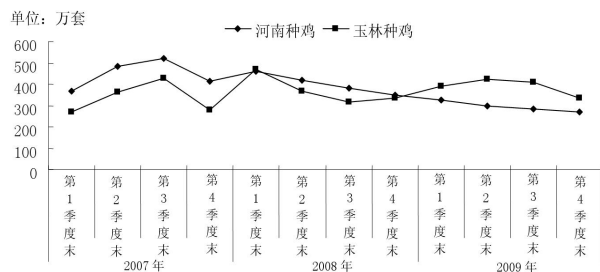


图2 社会种鸡存栏变化

河南地区种鸡养殖以麻黄鸡和青脚麻鸡为主,其次为快大黄鸡和土鸡类,另外还有少部分良凤花。与往年调研数据相比,麻黄鸡和快大黄鸡的比例降低,青脚麻鸡比例增大,土鸡类稳定。由于今年土2号相对其他品种来说行情较好,所以原来饲养土2号种鸡的养户养殖量有所增加。由于快大黄鸡行情变化较快,养殖者要承担较高的风险,所以快大黄种鸡养殖户主要是广东地区种禽

公司的合作户。

广西玉林地区主要以土鸡类种鸡养殖为主, 土鸡类肉鸡在 2009 年 10 月中旬行情开始走低, 一直持续到目前, 直接导致苗鸡价格波动, 影响种鸡企业的补栏积极性。小型孵化场近期淘汰减产较多, 占八成种鸡存栏量的大型企业在 12 月份基本完成种鸡淘汰工作, 部分企业有少量的后备种鸡补栏。抽样 2009 年 12 月种鸡存栏量 335 万套, 较第三季度减少 70 多万套, 减幅 18%。估计 2010 年第一季度广西种鸡存栏仍会处于 350 万套左右的较低水平。

2.2 广东地区种鸡存栏变化 抽样广东省内养殖公司 (个体)2009 年第四季度种鸡存栏 462 万套, 相比第三季度 (510 万套) 减少 50 万套左右, 其中大型专业种鸡企业减幅不大, 私人 and 小型企业减少较多, 种鸡存栏仍较为充裕。广东种鸡存栏中以快大鸡为主。2009 年快大鸡鸡苗价格理想, 种苗经营有一定效益, 所以种鸡存栏变化相对比较平稳。虽然现阶段广东地区种鸡开产量较少, 但后备鸡充足, 补栏期集中在 6-8 月份, 预计 2010 年 2 月份陆续开产, 3-4 月份达开产高峰, 对应 2010 年下半年商品鸡的出栏增加。

3 近三年主要品种鸡苗与饲料价格变化情况

3.1 近三年主要品种鸡苗价格变化情况 分析近三年鸡苗价格的变化 (见图 3), 鸡苗价格受季节性投苗影响, 变动较大。2009 年土项鸡苗价格接近或超过 2 元 / 羽的月份较少, 3 月份后基本都在 2 元 / 羽以下运行。土鸡种鸡企业 2009 年在种苗项目上的盈利情况基本不理想, 直接影响其持续经营发展的动力。2009 年快大鸡鸡苗价格也有波动, 全年平均仍能维持在 1.3~1.4 元 / 羽左右, 有一定的获利, 而且快大鸡种鸡企业多为大型企业, 经营比较稳定。竹丝鸡鸡苗价格相比 2008 年有所提高, 全年能维持在 2 元左右的水平, 对现

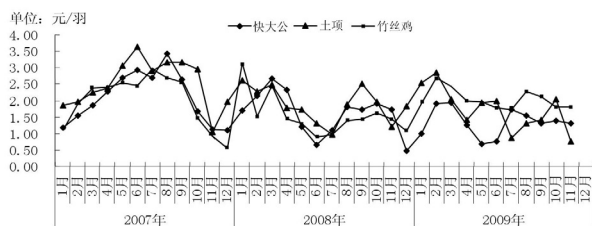


图 3 近三年鸡苗价格走势变化

有竹丝鸡养殖企业是一种激励, 有能力有动力去扩大产能。

3.2 近三年饲料价格变化情况 从图 4 可以看出, 饲料价格在 2007 年下半年大幅上升后, 2008 年下半年有所回落, 2009 年全年处于上升态势。从 2008 年下半年开始, 土 1 项肉鸡价格走势基本与饲料价格走势成反比, 2008 年至 2009 年前期的获利在 2009 年底开始回吐, 直接影响养殖投苗的积极性。而快大公鸡价格虽有波动, 但仍算平稳, 不断上升的饲料价格造成快大鸡养殖企业的经营压力加大。饲料价格的变动直接影响种鸡养殖, 鸡苗投放, 肉鸡成本等与肉鸡行情变化相关的因素。

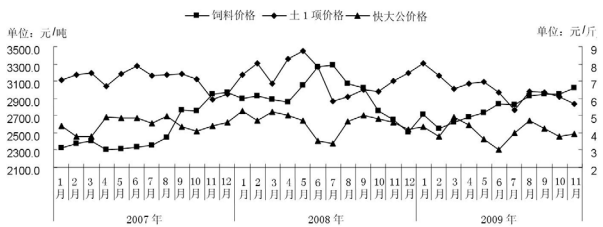


图 4 近三年饲料价格走势和主要品种肉鸡价格走势比较

4 2009 年珠三角地区肉鸡消费结构

2009 年珠三角地区肉鸡消费与 2008 年相比有所减少, 但减幅不大。肉鸡消费需求仍未回升。珠三角地区受金融风暴影响, 2008 年快大类肉鸡消费大幅减少, 至今已趋于稳定, 土鸡类等高档类肉鸡也出现减少的迹象, 整体肉鸡消费继续走弱。肉鸡消费品种结构变化不大, 以土鸡为代表的高档鸡已经占据广东肉鸡消费市场的主流 (见图 5)。以出口外贸企业为主要经济支柱的东莞深圳地区受金融风暴影响较大, 消费人群流失、经济活动减少直接导致肉鸡消费需求减少。

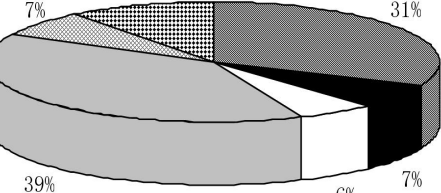
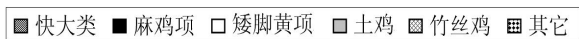


图 5 2009 年珠三角市场肉鸡品种结构

我省中小型猪场的生存空间

余德谦

(广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640)

中图分类号: S815.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0019-02

在我国现实条件下, 应实行规模化养猪与农户分散养猪相结合的两条腿走路的方针。适当规模的中小型养猪场, 更容易生存和发展。根据中华人民共和国国家标准《中小型集约化养猪经济技术指标》中规定规模养猪场的规模为: 小型场: 饲养生产母猪 300 头以下, 年产商品猪 5 000 头左右; 中型场: 饲养生产母猪 300~600 头, 年产商品猪 5 000~10 000 头。中小型猪场发展, 有其生存的基础和发展的意义。

1 适应农村设施畜牧业的发展

猪肉不但是我国肉类生产的主体, 也是城乡居民消费的主体。养猪业一直是增加农民收入、活跃农村经济、解决农村劳动力的主要途径之一。大力发展农村养猪业, 既能实现广大农民脱贫致富的愿望, 对于国计民生也是一件非常有利的东西。改革开放以来, 我省经济快速发展, 工业产业迅猛崛起, 单位面积产值相对较小的养猪场逐渐向外转移。而且猪场的环保难题与经济高速发展的矛盾日益突出。因此一些规模化猪场已从 2006 年开始实施搬迁, 向远郊、山区转移。

在远郊农村或山区养猪业最大优势是有大量的山地可以利用, 而且土地成本明显较平原地区低廉, 一般不占用耕地; 农村劳动力丰富, 工资报酬较低。大规模猪场对土地的面积、坡度、水源等配套设施要求较高, 而适当规模的猪场则不受这些影响, 可以因地制宜, 根据实际情况确定生产规模及综合发展的策略。

2 适应现代生态养猪业的发展

自发展集约化养猪生产以来, 中国养猪业面临疾病和污染问题的困扰。有些大型集约化猪场离人口密集市镇距离太近, 猪粪池和污水池满溢成为大患却找不到农田消化还原。究其根本原因, 问题还是在于中国养猪总体规模的布局 and 类型定

位上。按现代化的国际养猪生产理念, 猪场的规模设置必须经过资深专家论证, 确保其载畜量与周边生态环境相平衡。从中国具体国情出发, 大规模集约化猪场只能集中在交通发达的平原产粮区, 生产生长快的大型瘦肉猪。中小型猪场环保的压力相对较小, 污染问题较容易解决。在较偏僻的农村特别是山区具备发展生态农业的良好条件, 在猪场的建设上, 山区发展养猪业可以尽量选用荒山、荒坡地建设, 有一定的坡度和足够的荒地用于污水处理, 并配套相应的果园、鱼塘和绿化用地, 实现农、牧、渔的生态结合。这样既不占用耕地, 又有利于污水治理和生态利用, 实现养猪业和种植业、水产业的良性循环, 充分体现经济效益、社会效益和生态效益的结合。

3 有利于疾病的控制

大规模集约化、工厂化饲养的环境和流程, 容易造成猪群处于亚健康状态。现代的猪群越来越脆弱了, 一旦有应激反应, 这些猪就会表现精神沉郁、发热、采食量下降等临床症状。而这些感染往往是混合的, 易引起免疫抑制。能够降低猪抵抗力环境因素, 都可能促使猪群感染或发病。已经证明在过冷、过热、拥挤、断奶、混群、运输等应激状态下, 畜禽体内会产生热应激蛋白(HSP)等异常代谢产物, 同时某些激素(如类固醇)水平也会大幅提高, 它们将影响淋巴细胞活性。

此外, 由于疫苗和药物的滥用及其他免疫抑制因素的影响, 近年来猪的免疫抑制性疾病呈上升趋势。一方面使猪传染病呈现非典型感染和发病, 猪传染病典型症状消失给诊断带来极大的困难; 另一方面, 猪传染病病毒的毒力增强, 虽然经过免疫接种, 仍常造成免疫失败; 同时多种病原混合感染和复合症使疾病更为复杂, 特别是一些条件性、环境性病原微生物所致的疾病如猪繁殖和

呼吸综合征、喘气病、圆环病毒病、支原体肺炎等都影响猪的免疫功能,造成机体免疫麻痹、免疫耐受与免疫不全,接种疫苗时不产生免疫应答,造成不同程度的免疫抑制,这除容易导致细菌性疾病混合感染或继发感染外,更为严重的是导致相关疫苗免疫失败。

因此,大规模集约化养猪生产面临的疾病风险越来越大,由此而产生的成本则越来越高。而适当规模的养猪场的疾病的风险较低。其优势在于由于规模适当,且防疫的压力相对较小,需要接种的疫苗和使用的药物比大规模的养猪场少得多,大大地降低了这方面的成本。

4 有利于发展地方优质品种

我国有许多地方优质猪种具有抗病力强、肉质细嫩、风味俱佳等特点,是养猪业发展的珍贵的自然资源,又是价值极高的经济资源。我国要建立生态畜牧业大区,必须充分发挥现有地方猪种资源的作用。因此,各级畜牧行政主管部门在积极引进国外优良品种,加强猪杂交改良的同时,注意加强本地品种的选育和保护,充分利用我国地方猪种资源丰富的特点,大力培育品质好,繁殖率高,符合市场需求并具有一定特色的优良猪种。地方畜禽品种资源的保护与开发要本着“重点保护、分散开发”的原则。要进行地方品种的保护与开发,适当规模的饲养是一个很好的途径。因地方品种猪生长速度较慢,大规模饲养成本压力较大。适当规模饲养可充分利用多样化的地方物种资源,利用多样化的饮食文化资源,生产多样化的猪肉产品。例如部分猪场可以采用放牧式的饲养方式,这样可打造出精品地方猪品种,养出来的猪风味极佳。可以通过一定的营销策略,把这些猪肉以较高的价格销售出去,增加经济效益。我省部分猪场饲养的蓝塘猪、梅山猪就是通过这种形式来进行生产同时实现品种保护的目。

5 降低成本,减少投资风险

中小型规模养猪场虽然没有大规模猪场那样高投入、高产出的优势,相对于大型猪场,其规模效应也差一些。但综合比较,其在多个方面可以降低养猪的成本,从而降低了投资的风险。

5.1 减少固定资产的投资

5.1.1 租地成本相对较低 中小型猪场可根据土地的具体情况来确定规模,对土地的各方面要

求相对较低,因此,土地的租金会相对较便宜。

5.1.2 养猪设备的支出较低 中小型猪场对养猪设备如产床等不需要太高档,甚至可以自行设计安装。其他一些设备在满足猪的基本需求的情况下可以因陋就简。

5.1.3 粪便处理、污水处理等设施建设费用较低 大型猪场产生的粪便和污水一般没有配套的土地消纳,因此在有关粪便处理、污水处理等设备的建设和运作的费用大大地增加了企业生产成本。中小型猪场一般不存在这个问题,可根据周边种植业、水产养殖业等对粪便和污水的消纳能力来确定猪群的规模。

5.2 适当减少饲料的开支 规模适当的中小型猪场可充分利用本地的青饲料和地方副业作坊的副产品,如米糠、酒糟、粉渣、杂粕等。虽然生长速度不够快,但在一定程度上降低了成本。此外,还可以根据市场上肉猪的价钱,通过控制肉猪的生长速度来确定上市的时间,以提高养猪的效益。

5.3 减少药物和疫苗的支出 规模适当的中小型猪场由于防疫压力相对较小,疫苗的接种不必要像大型猪场那样频繁,或是不必使用过于昂贵的进口疫苗,还可根据疫病的具体情况灵活地调整免疫程序。

在药物的使用方面,大型猪场的集约式管理使其在疾病的控制过于依赖在饲料中投药和在饮水中投药,这样大大地增加了药物的成本。中小型猪场可以根据具体情况,侧重对个体的治疗,更多地采用注射给药的方式,减少大面积的投药,通过该项措施所节省的开支,是相当可观的。

5.4 其他支出 中小型猪场可以因地制宜,利用一些自然优势,利用天然水源或打井等,节省部分水电开支。其他一些费用,如办公费、招待费等也可以大幅度地削减。

与大型猪场相比较,中小规模养猪场也存在着许多的不足之处,如未能发挥养猪生产的规模效应,局部增加了成本,不利于高科技的应用和高层次人才发挥。但这些问题可通过组建联合体或建立养猪合作组织,还可以联合起来发展订单农业或期货买卖,形成市场经济链,这样可以降低养猪风险。总体来说,不管是现在还是将来,中小规模养猪还有存在和发展的基础。

一例猪弓形虫病的诊治与体会

石伟明, 肖碧青

(广东省鹤山市动物防疫监督所, 广东 鹤山 529700)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0021-01

2009年6月,鹤山市某规模化养猪场饲养的200头育肥猪发生了一种以高热、呼吸困难、皮肤发绀为主要症状的疾病,经现场观察、剖检病变及实验室检查,确诊为猪弓形虫病。现将有关情况报告如下。

1 发病情况

该批育肥猪从114日龄开始发病,发病的初期畜主疑为猪瘟并发链球菌病。曾用10倍量猪瘟弱毒疫苗进行紧急接种,以及用青、链霉素混合肌肉注射,1次/天,但未能有效控制病情。治疗过程中相继发病64头,发病率为32%,死亡36头,死亡率为18%。

2 临床症状

病猪表现为精神沉郁,食欲减退或废绝,体温升高至40.5~42℃,呈稽留热型。呼吸困难,呈腹式呼吸,伴有咳嗽。粪便干燥,尿液呈黄色。耳后、腹部、四肢内侧的皮肤有紫红色斑或出血点。体表淋巴结尤其是腹股沟淋巴结肿大明显。

3 剖检病变

全身淋巴结肿大、充血、出血,外观呈淡红色,切面多汁,边缘外翻。肺间质水肿,切开流出淡黄色透明液体或胶冻样物质。肝脏肿大呈灰红色,表面有针尖大的出血点。脾脏肿大呈棕红色,且有出血点。肾脏有出血点。大小肠粘膜有出血点。

4 实验室检查

4.1 涂片镜检 取发热病猪耳静脉血液抹片,用姬姆萨氏染色后镜检,可见典型的呈半月状、椭圆形的弓形虫滋养体,一端较尖,另一端较钝圆,胞浆呈淡蓝色,核呈紫红色偏向虫体的一端。

4.2 细菌的分离培养 以无菌操作取病死猪心血、肝脏、淋巴结分别接种于普通琼脂培养基和鲜血琼脂培养基上,经37℃培养24h后观察,未见

细菌生长。

4.3 动物实验 以无菌操作取病死猪肺脏、肝脏、淋巴结等病料,研碎后用生理盐水1:10稀释,每mL加入青霉素1000 IU和100 mg链霉素,在室温下放置1h,取0.5 mL上清液接种于小鼠腹腔,每天观察。4d后小鼠发病,表现为被毛粗乱,食欲废绝,腹部膨大,呼吸急促。剖检后取腹水涂片,用姬姆萨氏染色后镜检,可见大量的弓形虫滋养体。

5 治疗措施

5.1 抗虫 全群用磺胺六甲氧嘧啶拌料投喂,首次量按50~100 mg/kg体重,维持量按25~50 mg/kg体重用药,每天2次,连用5d。重症病猪用磺胺六甲氧嘧啶注射液肌肉注射,0.1 g/kg体重,1次/天,连用5d。

5.2 对症治疗 对发热的病猪用安乃近注射液肌肉注射5~10 mL/头,1次/天,连用5d。采取上述治疗措施后,病情逐渐好转,一周内基本控制了病情。

6 讨论与体会

6.1 该场发生此次疫情,笔者认为与以下两因素有关:一是该场栏舍卫生条件差,极少冲洗栏舍及消毒。二是该场养猫,猫是弓形虫的终末宿主,为了避免猫排出的弓形虫卵囊污染环境、饲料、饮水,猪场应禁止养猫。

6.2 在诊断本病时应与猪瘟鉴别诊断。本病与猪瘟在临床症状上和病理变化上相似,极易混淆。因此应进行实验室检查,以防误诊、误治。

6.3 防治本病的发生,除了平时加强饲养管理外,还应搞好栏舍的清洁卫生,每天定时打扫、冲洗,定期用百毒杀、百菌消等消毒剂进行消毒。

6.4 对于常发生本病的猪场,可定期投喂磺胺类药物进行预防。

猪沙门氏菌病的综合防治

孙凌志

(河南省南阳市城区动物卫生监督所, 河南 南阳 473009)

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0022-02

猪沙门氏菌病, 又称仔猪副伤寒, 是由致病性沙门氏菌引起的仔猪传染病。主要表现为急性败血症和坏死性肠炎, 慢性病例多为大肠坏死性炎症及肺炎。该病在我国很多地方的猪场时有发生, 特别是在饲养管理条件落后的猪场尤为严重, 甚至呈地方流行性, 严重影响了养猪业的发展。笔者近年来在实践中, 采用中西医结合的方法防治猪沙门氏菌病, 取得显著的疗效, 现总结如下。

1 平时预防措施

1.1 加强饲养管理 改善饲养管理和环境卫生条件, 饲养用具和环境要常清洗和消毒。投喂优质且易消化的饲料, 增强仔猪的抵抗力, 禁突然更换饲料。

1.2 注射疫苗 在本病常发地区, 30日龄左右时肌肉注射仔猪副伤寒冻干弱毒菌苗, 1 mL/只。

2 发病时紧急防控措施

2.1 隔离 将患病猪、疑似患病猪、健康猪分别隔离于符合动物防疫要求的相对独立的猪舍, 尤其注意将病猪隔离于不易散布病原体且便于诊疗和消毒的地方, 以防疫病的进一步传播。

2.2 彻底消毒 对病死猪的尸体进行销毁、深埋, 彻底清扫、洗刷猪舍、饲养工具, 将粪便、垫草、饲料残渣等及时清除干净, 对清理出的垃圾、被污染的垫料及废弃物等进行集中销毁, 同时可用酚类、氯制剂、碘制剂、过氧乙酸等消毒液对整个养猪场进行彻底喷雾消毒。

2.3 药物预防 对未发现症状的猪, 按每吨饲料中加入磺胺二甲嘧啶 100 g 的比例拌料饲喂, 连用 3~5 天; 同时在饮水中添加黄芪多糖、维生素、电解质、多维等, 以提高猪的体质和免疫力。

3 治疗措施

3.1 西药治疗 ①氟哌酸, 0.1~0.2 mL/kg 体重, 肌肉注射, 每日 1 次, 连用 3~5 天; 盐酸山莨菪碱, 1~2 mL/kg 体重, 肌肉注射, 每日 1 次, 连

用 3~5 天。②复方磺胺甲基异噁唑片, 70 mg/kg 体重, 首次加倍, 口服, 每日 2 次, 连用 3~5 天。③强效阿莫西林, 40~50 mg/kg 体重, 肌肉注射, 每日 1 次, 连用 3~5 天; 恩诺沙星, 2.5 mg/kg 体重, 肌肉注射, 每日 1 次, 连用 3~5 天。

3.2 中药治疗 组方 1: 败酱草 30 g、金银花 30 g、丹参 18 g、苦参 18 g、土茯苓 18 g、地丁 15 g、薏苡仁 15 g、丹皮 10 g、广木香 6 g (本方适用于急性型)。用法: 将上药置于锅内加热水 2 500~3 000 mL, 浸泡 30 min, 武火煮沸 10 min 后调为文火煎 20 min, 冷却后滤取药液 1 000 mL 左右, 混饮或拌饲料喂。每日 1 次, 连用 3~5 天。本方剂量为 20 只仔猪一天的用量, 临床应用时可视猪只数量的多少按比例增减。组方 2: 防风 18 g、白术 12 g、白芍 18 g、陈皮 12 g、苍术 18 g、白头翁 18 g、川楝子 18 g、薏苡仁 30 g、炮姜 9 g、附子 6 g (本方适用于慢性型)。用法: 同方 1。

4 典型病例

4.1 病例 1(急性型) 2009 年 9 月 12 日, 南阳市新野县某猪场 40 日龄的小猪突然出现体温升高至 42℃, 精神烦躁, 食欲不振。9 月 13 日开始出现持续性下痢, 粪便稀薄, 呈淡黄色, 恶臭, 并有寒颤现象, 呼吸急促。至 9 月 16 日, 死亡小猪 3 头, 死亡猪的耳根、胸前和下腹部皮肤出现紫红色斑块, 耳尖呈干性坏疽。该猪场兽医按猪沙门氏菌病用喹诺酮类药物, 具体剂量不详, 但效果不明显。至 9 月 20 日已先后死亡仔猪 9 头。遂在 9 月 20 日来我所求治。我们根据发病情况、临床症状和实验室检查结果, 诊断为猪沙门氏菌病。

治疗经过: 9 月 20 日初诊时, 给予西药: 强效阿莫西林 45 mg/kg 体重, 恩诺沙星 2.5 mg/kg 体重, 分别肌肉注射, 每日 1 次, 连用 3 天。中药: 败酱草 40 g、金银花 20 g、丹参 18 g、苦参 18 g、土

一例鸽蛔虫病的诊治

丁宁¹, 秦永康², 郑亚妹³

(1. 河源出入境检验检疫局, 广东 河源 517000; 2. 河源市光明鸽业有限公司, 广东 紫金 517463; 3. 深圳市光明集团公司大宝鸽场, 广东 深圳 518107)

中图分类号: S858.39

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0024-01

2007年5月,广东省河源市某养鸽场饲养的1 000只青年鸽和2 000对种鸽,发生不明原因的下痢、采食量减少、消瘦、口腔黏膜苍白、乳鸽发育不良等为主要特征的疾病。经病理解剖和实验室检验确诊为鸽蛔虫病。现将诊治情况报告如下。

1 发病情况

青年鸽先发病,后传染到种鸽和乳鸽,青年鸽发病率达到76%,死亡12只;种鸽未见死亡,症状不明显,眼观口腔黏膜苍白。病程一个月并伴有下痢,曾用青霉素等抗生素,按一般细菌病治疗,但疗效不明显。

2 临床症状

病鸽精神不振、贫血,黏膜苍白,病鸽消瘦,胸肌严重萎缩;多伴有严重腹泻;拉白色或绿色稀粪;便中有时带血或粘液,肛周羽毛被污染;食量减少,体质瘦弱;种鸽产蛋量减少;有的病鸽出现头颈歪斜等神经症状。出现症状的青年鸽一周左右发生死亡。

3 病理变化

剖检病死鸽12只,可见肠管苍白、肿胀,剖开肠管见肠壁增厚,有白色坏死灶,黏膜充血、出血,内有大量淡黄白色的线虫,缠绕在一起几乎充塞整个肠道,虫体长约20~40 mm,尚有零星的尚未达到性成熟的细小幼虫。严重者虫体充满整个肠道。

4 实验室检查

采集新鲜的泄殖腔粪便,采用饱和盐水浮集法,滤掉杂质,静置20 min,抹片在显微镜下能观察到浅棕色、椭圆形蛔虫虫卵。根据虫体特征、临床症状、发病情况、剖检变化及实验室检查结果,诊断为蛔虫病。

5 防治措施

5.1 将病鸽隔离饲养,粪便集中发酵处理,鸽舍

彻底消毒。

5.2 治疗:用盐酸左旋咪唑25 mg/只,早晨空腹一次拌料服用,一般一次即可,特别严重的可连喂两次。同时因肠道有损伤需加100 mg/kg恩诺沙星,以促进肠壁尽快修复。另需补充多种维生素,在保健砂中加入维生素A和维生素C。

5.3 驱虫后及时清扫、处理粪便,消毒场舍,以杀灭被驱出的虫体及虫卵,杜绝传染来源。以后每隔3~6个月驱虫1次。

经上述措施治疗一周后,该群鸽子精神、食欲恢复正常,嘴巴、面部皮肤逐渐红润。

6 小结

本病是鸽子常见的一种内寄生虫病,虫体寄生于鸽的小肠,夺取营养物质,破坏肠壁细胞,影响肠的吸收消化功能,鸽明显消瘦,消化吸收功能障碍,生长发育受阻,严重的也可导致死亡。饲料、饮水、保健砂、土壤、垫料被带有虫卵的粪便污染,都是本病的主要传染途径。各种日龄的鸽都可感染发病,幼鸽易受感染,尤其是青年鸽更易感染,病情也较成鸽严重。成鸽的易感性较低,即使感染,病程也较长,只有虫体较多时,才会引起严重损伤以至死亡。维生素A等营养成分不足和缺乏,会促使本病暴发,无症状的球虫感染鸽对蛔虫的易感性增强。

防治本病主要是搞好鸽舍卫生,尤其要及时清除粪便,要求1~3天清粪一次,杜绝传染来源。确保饲料和饮水清洁卫生;鸽舍、食槽以及饮水器等要每天清洗,定期消毒;最好能做到鸽子在笼子或网上饲养,避免鸽子与粪便、地面直接接触。同时要定期驱虫,减少场地污染。一般童鸽每2~3个月全群驱虫1次;成鸽每年驱虫2次。注意补充维生素A,有较好疗效。

木瓜蛋白酶和苜蓿对断奶仔猪生长性能的影响

刘景环, 王永雄, 周群, 康红军, 王东

(西南大学 重庆高校草食动物工程研究中心, 四川 重庆 400716)

摘要: 选取杜×长×大三元杂断奶仔猪 171 头作为实验动物, 研究木瓜蛋白酶的添加和苜蓿替代部分豆粕后对断奶仔猪腹泻、生产性能的影响。结果表明: 添加木瓜蛋白酶后对仔猪的生长有促进作用, 平均日采食量增加 2.7%、平均日增重提高 2.56%、料重比分别提高 2.7%、2.56%和降低 1.6%。添加木瓜蛋白酶并用苜蓿替代 5%的豆粕对仔猪的生长也有促进作用, 平均日采食量增加 10.8%、平均日增重提高 7.69%、料重比降低 1.03%。

关键词: 木瓜蛋白酶; 苜蓿草粉; 断奶仔猪; 生长性能

中图分类号: S816.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0025-03

Effects of papain and alfalfa on growth performance in weaned piglets

Liu Jinghuan, Yu Yongxiong, Zhou Qun, Kang Hongjun, Wang Dong

(Herbivore Engineering Research Center, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 171 cross breeding pigs were selected as experimental animals for studying the influence of adding papain and alfalfa (replacing part of soybean) on production performance and diarrhea of weaned piglets. The results showed that adding papain could promote piglets' growth. The average daily feed intake increased 2.7%, the average daily gain increased 2.56% and feed/gain ratio decreased 1.6%. Adding papain and alfalfa (replacing 5% soybean) could promote the growth of piglets. The average daily feed intake increased 10.8%, the average daily gain increased 7.69% and feed/gain ratio decreased 1.03%.

Key words: Papain; alfalfa hay meal; weaned piglets; growth performance

传统养猪业使用谷物和动植物蛋白质及添加剂配制日粮。然而近年来, 动物蛋白质来源有限且价格昂贵, 开辟新的蛋白质来源, 利用植物蛋白饲料, 以降低饲养成本, 提高经济效益, 具有现实意义。

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是世界上种植面积较大的一种多年生豆科牧草, 具有产草量高、适应性强、草质优良、营养丰富、适口性好、易于家畜消化等特点^[1,2]。苜蓿草粉富含蛋白质、矿物质、维生素和色素, 且含皂苷、多糖等物质及多种目前尚未为人认识的促生长和繁殖因子, 在饲料中添加适宜比例的苜蓿草粉对提高动物的生产性能、繁殖性能、免疫机能和产品质量都有促进作用。

目前对于苜蓿添加到生长猪、妊娠母猪和哺乳母猪饲料中的应用研究较多^[3~5], 然而对于苜

蓿在仔猪饲料中应用研究较少。本研究的目的在于探讨木瓜蛋白酶的添加和苜蓿替代部分豆粕后对仔猪生长性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验仔猪 试验选用广西博白县生态养猪场提供的杜×长×大三元杂断奶仔猪。选取体重为 11.13±0.19 kg 的健康断奶仔猪 171 头, 断奶日龄为 28 d。

苜蓿草粉由西南大学牧草实验室提供。该苜蓿于初花期刈割, 自然干燥后加工成苜蓿草粉。其中营养成分含量分别为粗蛋白 22.58%, 粗脂肪 3.14%, 粗纤维 28.45%, 粗灰分 8.60%, 无氮浸出物 37.22%, 钙 2.29%, 磷 0.51%。

1.1.2 试验分组与设计 选择 28 d 断奶仔猪 171 头, 随机分为对照组和试验组共 3 个处理组, 各处理组间试验仔猪体重经统计检验差异不显著 ($P>0.05$)。试验设 1 个对照组和 2 个试验组, 每个试验组 3 个重复, 每个重复 19 头猪。对照组 A 饲喂基础饲料, 试验组 B 饲喂添加了 0.3% 木瓜蛋白酶的饲料, 试验组 C 饲喂添加了 0.3% 木瓜蛋白酶并用苜蓿草粉替代 5% 豆粕的饲料, 试验组 D 与试验组 C 处理方式相同但是采用湿喂方式 (木瓜蛋白酶在一定酶解的条件下对豆粕与苜蓿的混合物进行水解后再与剩余料混匀后饲喂)。试验期为 28 d。

猪舍为双列式, 高床圈养群饲 (19 头 1 栏), 通风良好, 采用乳头式饮水器, 自由饮水。试验仔猪自由采食, 每日投料 5 次 (8:30、11:00、13:30、16:30、20:30 各投料一次), 每次喂量以吃饱后饲槽内略有余料为度^[6]。试验前对圈舍进行彻底消毒, 并冲洗地面。试验开始后, 猪舍每天早晚各清扫 1 次, 冲洗地面 2 次, 其它日常管理和卫生防疫按养殖场常规方法进行。

首先进行预饲, 时间为 7 天。预饲结束后, 开始正式试验。正式试验开始前对每圈仔猪空腹称取体重, 试验进行过程中观察仔猪采食和健康状况, 每天晚上收集饲料残留量, 记录发病情况。

1.2 日粮组成及营养水平 试验基础饲料营养水平参照《猪营养需要》(NRC, 1998) 与中国《猪饲养标准》(NY/T65-2004) 设计。基础饲料组成及营养水平见表 1。

1.3 试验时间和地点 2008 年 10 月 21 日至 2008 年 11 月 18 日, 试验期共 28 d。试验地点为广西博白县生态养猪场。

1.4 检测指标

1.4.1 试验观察 从试验开始, 每日观察并记录仔猪的精神状态、饮食、排粪及死亡情况。

1.4.2 生产性能测定 在试验开始与结束时的清晨以栏为单位进行空腹称重; 以栏为单位每天记录采食量, 回收剩料并称重 (耗料量 = 投料量 - 剩料量); 计算平均日采食量, 平均日增重和料重比。

1.4.3 发病和腹泻情况观测 用仔猪腹泻率表示腹泻情况。每日观察断奶仔猪排粪情况, 记录各栏猪只腹泻个体耳标号及腹泻发生的持续天数。

1.5 数据处理 本试验数据采用 Excel 软件中

的单因素方差分析进行统计分析, 若经 F 检验差异显著者再用 LSD 法进行多重比较^[7]。试验结果均以平均数加减标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示。

表 1 基础饲料组成及营养水平

原料组成	对照组 (%)	替代 3% (%)
玉米	53	52.31
豆粕	23	22.31
苜蓿	-	1.38
膨化大豆	4	4
花生粕	2	2.1
油糠	4	4.11
小麦	4	4
次粉	3	3
进口鱼粉	2	2
磷酸氢钙	1.5	1.45
石粉	0.9	0.84
食盐	0.3	0.3
预混料	1.5	1.5
防霉剂	0.1	0.1
抗氧化剂	0.4	0.3
甜味剂	0.3	0.3
消化能 (MJ/kg)	3.2	3.2
代谢能 (MJ/kg)	2.85	2.84
粗纤维 (%)	2.75	3.12
粗蛋白 (%)	19.96	19.95
粗脂肪 (%)	3.99	3.98

2 结果与分析

2.1 对仔猪生产性能的影响 木瓜蛋白酶的添加和苜蓿替代 5% 的豆粕对断奶仔猪生产性能的影响见表 2。试验结果显示, A、B、C、D 各组平均日增重分别为 0.39 kg、0.4 kg、0.42 kg、0.38 kg。与对照组 A 相比, B 组平均日增重提高了 2.56%, C 组提高了 7.69%, D 组下降了 2.56%, 但差异都不显著 ($P>0.05$)。

试验期间, A、B、C、D 各组平均日采食量分别为 0.74 kg、0.76 kg、0.82 kg 和 0.72 kg。与对照组 A 相比, B 组平均日采食量提高了 2.7%, C 组提高了 10.8%, D 组降低了 2.7%, 但差异都不显著 ($P>0.05$)。A、B、C 各组料重比分别为 1.93、1.90、1.91、1.93。与对照组 A 相比, B、C 组的料重比降低, 但差异均不显著 ($P>0.05$)。说明添加木瓜蛋白酶, 添加木瓜蛋白酶干酶并用苜蓿替代 5% 的豆粕对仔猪的日增重、日采食量都有促进的趋势。

2.2 对仔猪抗病力的影响 木瓜蛋白酶的添加和苜蓿替代 5% 的豆粕对断奶仔猪抗病力的影响见表 3。由表 3 可知 B、C 组的总发病率降低 29.7%、20%, D

表 2 添加木瓜蛋白酶及用苜蓿代替 5%的豆粕对仔猪生产性能的影响

项目	对照组 A	试验组 B	试验组 C	试验组 D
平均初重(kg)	11.05±0.13	11.05±0.15	11.39±0.15	10.96±0.30
平均末重(kg)	21.84±0.31	22.37±1.07	23.14±0.31	21.56±0.56
平均增重(kg)	10.79±0.20	11.32±1.09	11.75±0.34	10.61±0.42
平均日采食量 ADF(kg/d)	0.74±0.04	0.76±0.06	0.82±0.06	0.72±0.02
平均日增重 ADG(kg/d)	0.39±0.01	0.4±0.04	0.42±0.01	0.38±0.02
料重比(F/G)	1.93±0.09	1.90±0.03	1.91±0.11	1.93±0.02

表 3 添加木瓜蛋白酶及用苜蓿代替 5%豆粕对仔猪抗病力的影响

项目	对照组 A	试验组 B	试验组 C	试验组 D
试验时间(d)	28	28	28	28
猪总数(头)	57	57	57	57
全期发生疾病数(头)	10	7	8	12
总得病率(%)	17.5	12.3	14	21.2

组与对照组 A 相比虽有增高但差异不显著。

3 小结与讨论

3.1 木瓜蛋白酶的添加和苜蓿替代 5%的豆粕对断奶仔猪生产性能的影响 在仔猪的饲养过程中, B 组添加木瓜蛋白酶后提高了仔猪的平均日增重和平均日采食量, 比对照组分别提高了 2.56% 和 2.7%; C 组添加木瓜蛋白酶干酶并用苜蓿替代 5%的豆粕后, 提高了仔猪的平均日增重和平均日采食量, 比对照组分别提高了 7.69% 和 10.8%; D 组比对照组降低了 2.56% 和 2.7%, 但差异都不显著 ($P > 0.05$)。这说明添加木瓜蛋白酶对仔猪的日增重和日采食量有促进的趋势但效果不是很明显, 用苜蓿替代 5%的豆粕后对仔猪的日增重和日采食量无明显影响, 相反还有一定的促进趋势。猪饲喂苜蓿日粮采食量提高, 原因在于日粮中纤维含量增加, 刺激挥发性脂肪酸产生, pH 下降, 大肠杆菌的数量下降。肠杆菌是猪肠道中非常重要的微生物, 它能解除氨基酸的羧基, 致使酪胺、色胺、酪氨酸和色氨酸的衍生物合成减少, 进而减弱对丘脑下部饱中枢的刺激, 猪的采食量便上升。猪采食苜蓿后, 纤维素刺激胃肠的蠕动, 消化物通过胃肠道的速度加快^[8]。

3.2 不同处理方式的木瓜蛋白酶和苜蓿替代 5%的豆粕对断奶仔猪料重比的影响 与对照组相比, B、C 组的料重比均下降但差异不显著, 这说明添加木

瓜蛋白酶对仔猪的养分利用率有提高的趋势但效果不明显, 添加木瓜蛋白酶并用苜蓿草粉替代 5%的豆粕对仔猪养分的利用率有一定促进效果。

3.3 不同处理方式的木瓜蛋白酶和苜蓿替代 5%的豆粕对断奶仔猪抗病力的影响 仔猪断奶后因饲料结构、饲养环境等因素的改变而导致免疫力下降, 使其肠道内结构物改变和微生物区系失调, 从而使饲料组分在肠道内发酵引起腹泻。少量优质的苜蓿草粉中纤维素产生的丁酸盐能保护肠道的生理结构, 使肠道保持良好的形态, 同时产生的挥发性脂肪酸还可通过影响水分吸收和抑制病原微生物生长起到抗腹泻作用^[9]。由表 3 可知在添加木瓜蛋白酶干酶的情况下用苜蓿替代 5%的豆粕能提高仔猪的抗病力, 但湿喂的情况下仔猪的抗病力下降原因在于湿喂时饲料易发馊变质, 仔猪采食后易发生腹泻。

参考文献:

- [1] 王成章. 饲料生产学[M]. 郑州: 河南科技出版社, 1998.
- [2] 樊文娜, 史鹏飞, 王成章, 等. 苜蓿草粉的营养研究与应用[J]. 饲料与饲养, 2008, (4): 18-21.
- [3] 郑会超, 黄新, 蒋永清, 等. 苜蓿草粉对杜洛克生长猪生长性能和养分消化的影响[J]. 饲料工业, 2006, 27(19): 38-39.
- [4] 臧为民, 廉红霞, 王成章, 等. 不同水平苜蓿草粉对哺乳母猪及其仔猪生长性能及血清指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(2): 55-60.
- [5] 廉红霞, 王成章, 杨雨鑫, 等. 不同苜蓿草粉添加水平对妊娠母猪及其仔猪生产性能的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(6): 35-40.
- [6] 潘存霞, 王永雄, 董国忠. 蒿属植物提取物对动物生产性能和免疫功能的影响[D]. 重庆西南大学出版社, 2004. 30.
- [7] 俞渭江. 生物统计附实验设计[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [8] 杨富裕. 苜蓿在猪饲料中的应用[J]. 养猪, 2000, (1): 8-10.
- [9] 沈桃花, 李雁冰. 苜蓿草粉在仔猪日粮中的应用[J]. 饲料研究, 2006, 63(12): 42-44.

猪繁殖与呼吸综合征病毒 E 基因的克隆及其腺病毒表达载体的构建

邓碧亮¹, 顾万军², 黄毓茂^{3*}

(1. 河源市动物疫病预防控制中心, 广东 河源 517000; 2. 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231; 3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 本研究通过 RT-PCR 方法扩增猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) GD 株的 E 蛋白基因, 克隆至穿梭质粒 pShuttle-CMV vector 中, 构建腺病毒重组表达载体。经过抗性筛选、PCR 扩增、单酶切等方法对其进行鉴定, 确定得到了含有目的基因的阳性克隆, 成功构建了腺病毒表达载体 pAd-E。同时转染 293 细胞并进行了初步鉴定, 进一步的研究还在继续。本研究为 PRRSV 结构蛋白功能及其基因工程疫苗研究奠定了基础。

关键词: PRRSV; 基因克隆; 重组腺病毒

中图分类号: S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0028-03

The clone of E gene of PRRS virus and construction of its adenovirus expression vector

DENG Bi-Liang¹, Gu Wan-jun², HUANG Yu-Mao^{3*}

(1. Heyuan Center for Animal Disease Prevention and Control, Heyuan 517000, China; 2. School of Life Science of FoShan University, FoShan 528231, China; 3. College of Veterinary Medicine, South Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The E Gene of PRRS virus strain GD was amplified through RT-PCR and cloned into the vector pShuttle-CMV to construct recombinant adenovirus expression vector. The positive clone was identified by antibiotic resistance, PCR and restriction endonuclease analysis. The recombinant adenovirus expression vector was successfully constructed. The 293 cell was transfected with vector pShuttle-CMV and the further experiment would be done later. This experiment played a role for the research of structural protein function and gene engineered vaccine.

Key words: PRRSV; gene clone; recombinant adenovirus

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)主要引起母猪的繁殖障碍和仔猪的严重呼吸障碍。自从1996年我国首次证实存在该病之后^[1],因其高度传染性迅速遍及全国各地,给我国养猪业造成了很大的经济损失。2006年上半年以来全国各地发生的疫情更使此病的控制难度加大。由于目前的常规疫苗都不太理想^[2],因此,新的PRRSV基因工程疫苗的研制一直都是该病研究的热点之一。

PRRSV为单股正链RNA病毒,属于动脉炎病毒科Arteriviridae成员,基因组全长约15 kb,包括8个开放阅读框^[3]。PRRSV的ORF5基因编码的糖基化囊膜蛋白(E蛋白)具有较好的免疫原性,

能够诱导产生中和抗体,且中和抗体出现之后,抗血清主要识别E蛋白^[4]。此外,E蛋白还具有诱导细胞凋亡、参与病毒粒子与病毒受体结合等过程的作用^[5]。因此,E蛋白在PRRSV的致病性、诊断、预防和控制等方面均具有重要意义,也是目前研制PRRSV基因工程疫苗的首选基因。本研究拟构建E基因腺病毒表达载体,以期能为后期基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、质粒和细胞 PRRSV广东分离株(GD):由本实验室分离保存。Marc-145细胞由华南农业大学动物科学学院马静云老师惠赠。质粒pShuttle-CMV vector、菌株BJ5183-AD-1感受

收稿日期:2009-11-03

*:通讯作者

态细胞、XL10-Gold 超级感受态细胞、AD-293 细胞均为 Stratagene 公司产品; 大肠杆菌 DH5a 菌株为本实验室保存。

1.2 工具酶与试剂 EX Taq 酶, 限制性内切酶 Bgl II 和 EcoRV, T4 DNA 连接酶等均为 TaKaRa 公司产品; Pme I、Pac I 为 Stratagene 公司产品。LipofectamineTM 2000 为 invitrogen 公司产品。

1.3 特异性引物 根据 Genbank 中收录的 PRRSV CH-1a 的基因序列, 设计一对 ORF5 的引物, 扩增产物片段长度为 603 bp。引物序列如下: E-S: 5'-GGAAGATCTCCACCATGTTGGGAAATGCTT-3' E-A: 5'-CCGATATCCTAGAGACGACCCATTGTTC-3' (加下划线处分别为 Bgl II 和 EcoRV 酶切位点)。

1.4 E 基因的扩增 将 PRRSV-GD 株接种于 Marc-145 细胞, 待细胞病变达到 80% 左右时收获病毒。按常规方法提取病毒基因组 RNA, 利用特异性引物对 PRRSV 的 cDNA 进行 PCR 扩增。

1.5 E 基因的克隆及鉴定 按常规方法将 E 基因克隆至 pMD18-T 载体上, 并对重组质粒进行双酶切鉴定。

1.6 pShuttle-E 质粒的构建及鉴定 将 pShuttle-CMV vector 和 E 基因纯化回收产物分别进行 Bgl II 和 EcoRV 的双酶切, 酶切产物通过 T4 DNA 连接试剂盒连接, 连接产物再转化 DH5a 感受态细胞, 利用卡那霉素抗性初步筛选和菌液 PCR、双酶切对重组质粒进行鉴定。同时送阳性菌液进行测序。

1.7 重组腺病毒质粒 pAdeno-E 的构建及鉴定 利用 PmeI 将穿梭质粒 pShuttle-P7 线性化, 纯化回收后转化含有腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细胞, 经菌液 PCR 和 Pac I 对重组腺病毒质粒进行鉴定。

1.8 重组腺病毒质粒 pAdeno-E 转染 293 细胞 鉴定为阳性的重组质粒再经转化 XL-10 GOLD 超级感受态细胞后大量提取质粒。经 Pac I 酶切纯化回收后, 参照 LipofectamineTM 2000 脂质体说明书转染 AD-293 细胞。

1.9 各代细胞培养物中 E 基因的检测 转染后待细胞出现 80% 左右病变后收集病毒液, 连续传代至第 5 代, 收集各代细胞培养物, 用酚-氯仿法抽提病毒 DNA, 直接 PCR 进行 PRRSV E 基因的检测。

2 结果

2.1 E 基因扩增结果 从 PRRSV-GD 株感染的

Marc-145 细胞培养物中提取总 RNA 中, 扩增出一条约 603 bp 的目的条带(图 1), 结果与预期相符。

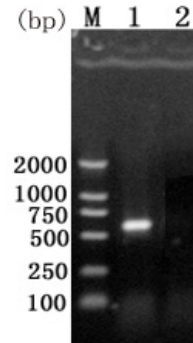


图 1 PRRSV E 基因扩增结果

M: DNA Marker DL, 2000; 1: PCR 产物; 2: 空白对照

2.2 重组质粒的双酶切鉴定 利用 Bgl II 和 EcoRV 两种内切酶对重组质粒进行双酶切鉴定, 筛选出阳性重组质粒, 结果获得约 603 bp 的目的片段(图 2)。说明 E 基因片段已成功克隆入 pMD18-T 载体。

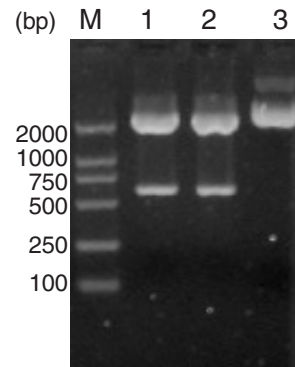


图 2 重组质粒双酶切鉴定

M: DNA Marker DL, 2000; 1~2: 重组质粒双酶切产物; 3: 重组质粒空白对照

2.3 pShuttle-E 质粒的鉴定 将 PRRSV 的 E 基因克隆至 pShuttle-CMV 载体中, 命名为 pShuttle-CMV-E。经 Bgl II 和 EcoRV 双酶切鉴定(图 3), 测序结果亦表明重组质粒含有 PRRSV 的 E 蛋白全基因序列, 且阅读框正确, 证明 E 基因已成功插入 pShuttle-CMV 载体中。

2.4 重组腺病毒质粒 pAdeno-E 的酶切鉴定 pShuttle-CMV-E 经 PmeI 线性化后, 转化含有腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态细胞, 同源重组质粒经 Pac I 酶切可获得约 30 kb 和 4.5 kb 两条带, 同时设未酶切对照, 结果得到一条在加样孔以下的较大条带和一条约 23 kb 条带, 均与预期结果相符(图 4), 将其命名为 pAd-E。

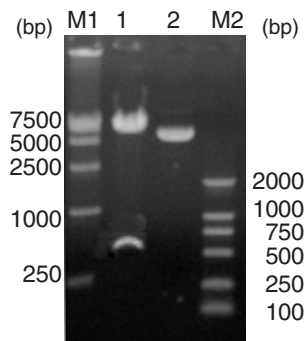


图3 pShuttle-CMV-E 质粒双酶切鉴定

M1: DNA Marker DL, 15000; 1: 重组质粒双酶切产物; 2: 重组质粒空白对照; M2: DNA Marker DL, 2000

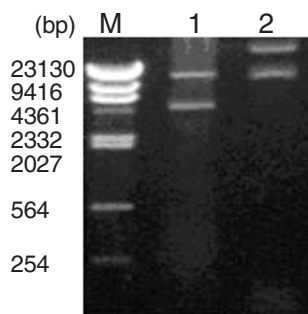
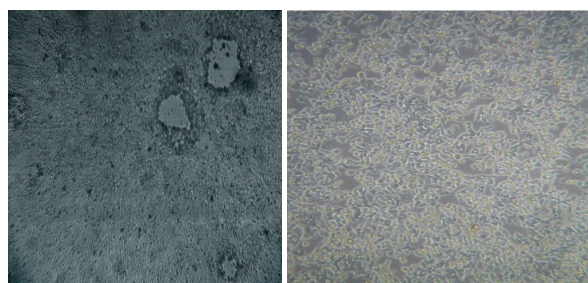


图4 同源重组腺病毒质粒的 Pac I 酶切鉴定

M: λ -HindIII digest; 1: 同源重组质粒 Pac I 酶切产物; 2: 同源重组质粒对照

2.5 转染 293 结果及重组腺病毒的初步鉴定 转染 AD-293 细胞后, 第一代细胞在转染后第 5 天开始出现细胞病变(图 5)。收集 1~5 代细胞培养物, 对 PRRSV E 基因进行检测, 结果均可获得 603 bp 左右的目的条带(图 6), 表明 pAd-E 中 PRRSV E 基因的 mRNA 在 AD-293 细胞中获得了表达。



A: 293 病变细胞

B: 正常 293 细胞

图5 293 转染后细胞形态

3 讨论与结论

本研究采用腺病毒表达系统是由于其具有许多独特的优点: 腺病毒粒子相对稳定, 病毒基因组重排频率低, 易于用重组 DNA 技术操作; 安全性较好, 腺病毒无需整合进宿主细胞基因组中, 目的基

因在宿主细胞基因组外游离状态下表达, 整合突变致癌可能性小, 基因毒性低; 腺病毒基因组较大(36 kb), 容纳大片段外源性基因的潜力大(约 35 kb); 宿主范围较广; 腺病毒载体容易将外源基因直接转移到靶细胞中, 并有效表达成活性蛋白。在本试验中, 选用质粒 pShuttle-CMV 作为克隆载体, 构建了含有 PRRSV E 基因的重组腺病毒表达载体 pAd-E, 并经过抗性筛选、PCR 扩增、双酶切等方法对其进行了鉴定, 确定得到了含有目的基因的阳性克隆。

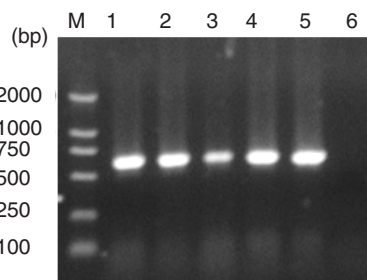


图6 各代细胞培养物 E 基因的检测

M: DNA Marker DL, 2000; 1~5: 各代细胞培养物 PCR 产物; 6: 正常细胞培养物空白对照

本研究成功构建了 PRRSV E 基因重组腺病毒表达载体, 将重组腺病毒表达载体转染 293 细胞, 并经过 RT-PCR 方法进行了初步鉴定, 为进一步进行 PRRSV 蛋白结构功能的研究及其基因工程疫苗研制工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1996, (2): 1-4.
- [2] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs[J]. Vet Diagn Invest, 1992, (4): 117-126.
- [3] Meulenber J J M, Besten A P, de Kluyver E P, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. Virology, 1995, 206: 155-163.
- [4] Sur J H, Doster A R, Osorio F A. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Vet Pathol, 1998, 35(6): 506-514.
- [5] Delpute P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, et al. Involvement to the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages[J]. J Virol, 2002, 76(9): 4312-4320.

鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白 B 细胞抗原表位预测

李 玉, 李功勇, 黄军龙

(清远市动物卫生监督所, 广东 清远 511515)

摘要: 以鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的基因组序列为基础, 采用 Garnier-Robson 方法、Chou-Fasman 方法和 Karplus-Schultz 方法预测 VP2 蛋白质的二级结构; 用 Kyte-Doolittle 方案预测蛋白质的亲水性; 用 Emini 方案预测蛋白质的表面可能性; 用 Jameson-Wolf 方案预测氨基酸的抗原性指数。综合分析, 预测 VP2 蛋白的抗原表位。通过以上几种方法预测 IBDV 病毒 VP2 蛋白的 B 细胞表位位于 VP2 蛋白 N 端 3-10、30-45、77-84、150-157、197-206、211-222、278-288、298-303、315-325、376-381、386-394、403-411、415-425 区段。

关键词: 法氏囊病毒; VP2 蛋白; B 细胞表位; 二级结构; 预测

中图分类号: S855

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0031-05

B cell epitopes prediction of VP2 protein of IBDV

Li Yu, Li Gongyong, Huang Junlong

(Qingyuan Institute of Animal Health Supervision, Qingyuan 511515, China)

Abstract: The secondary structure of the VP2 protein of IBDV was predicted using the methods of Garnier-Robson, Chou-Fasman and Karplus-Schultz according to the genome of IBDV. The hydrophilicity plot, surface probability plot and antigenic index were obtained by the methods of Kyte-Doolittle, Emini and Jameson-Wolf respectively. Combining the above results the B cell epitopes for the VP2 protein were located at the n-terminal 3-10,30-45,77-84,150-157,197-206,211-222,278-288,298-303,315-325,376-381,386-394,403-411, and 415-425 regions.

Key words: Infectious bursal disease virus; VP2 protein; B cell epitope; secondary structure; prediction

鸡传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病。病毒在法氏囊的 B 淋巴细胞中迅速繁殖, 引起严重的免疫抑制, 从而导致疫苗免疫失败和继发感染, 对养鸡业造成严重的经济损失^[1]。IBDV 属双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属, 基因组包括大 (A) 小、(B) 两个节段, 编码五种病毒蛋白: VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5^[2,3]。VP1 由 B 节段编码, 具有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶活性。其他 4 种病毒蛋白由 A 节段编码, VP4 为病毒自身蛋白酶, VP5 的功能尚不明确, VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白, 构成病毒衣壳。VP2 占病毒蛋白的 51%, 既是 IBDV 的主要结构蛋白, 又是病毒的主要宿主

保护性抗原, 与病毒中和抗体的诱导、抗原性和毒力的变异以及细胞凋亡的诱导等有关^[4,5]。

迄今为止, IBDV VP2 的抗原表位的研究已有详细的报道: 主要集中于两个亲水区, Cui 利用噬菌体展示肽库 (基因特异性肽库) 得出构象表位位于 VP2 高变区 204~344aa^[4,5]; Wang 通过噬菌体展示肽库 (随机肽库) 和肽扫描法筛出位于 VP2 197~209aa 和 329~337aa 两个线性中和表位。本研究运用计算机软件分析和预测 VP2 蛋白的二级结构和 B 细胞表位, 为合理选择 B 细胞优势表位, 进而为制备单克隆抗体和合成肽疫苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 IBDV VP2 蛋白氨基酸序列 IBDV VP2 蛋

白氨基酸序列由标准毒株的基因组序列推导得出,检索自 GENBANK (AX721980),共有 453 个氨基酸残基(图 1)。

```

MTNLQDQTQQ  IVPFIRSLLM  PTTGPASIPD  DTLEKHTLRS  ETSTYNLTVG  DTGSGLIVFF  PGFPGSIVGA  HYTLQSNNGY
KFDQMLLTAQ  NLPASYNYCR  LVSRSLTVRS  STLPGGVYAL  NGTVNAVTFQ  GSLSELT DVS  YNGLMSATAN  INDKIGNVLV
GEGVTVLSLP  TSYDLGYVRL  GDPIPAIGLD  PKMVATCDSS  DRPRVYTITA  ADDYQFSSQY  QPGGVTTITLF  SANIDAITSL
SIGGELVFQT  SVQGLVLGAT  IYLIGFDGTT  VITRAVASDN  GLTAGTDNLM  PFNLVIPTNE  ITQPITSIKL  EIVTSKSGGQ
AGDQMSWSAS  GSLAVTIHGG  NYPGALRPVT  LVAYERVATG  SVTVVAGVSN  FELIPNPELA  KNLVTEYGRF  DPGAMNYTKL
ILSERDRLGI  KTVWPTREYT  DFREYFMEVA  DLNSPLKIAG  AFGFKDIIRA  IRR
    
```

图 1 IBDV VP2 蛋白氨基酸序列

1.3 VP2 蛋白的亲水性、表面可及性、抗原性指数预测 按 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水性指数方案,预测其亲水性;按 Emini 方案预测蛋白质的表面可及性;按 Jameson-Wolf 方案预测抗原性指数。各方案参数的意义见文献^[4-8]。

1.4 Kolaskar-Tongaonkar 方法预测大于 7 个氨基酸的 VP2 的抗原表位 分析结果可以直接给出抗原表位的序列。序列提交及分析网址为:http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input。

2 结果

2.1 IBDV 病毒的 VP2 蛋白预测的二级结构 如图 2,按 Gamier-Robson 方法,Chour-Fasman

1.2 VP2 蛋白的二级结构预测 采用 Gamier-Robson 方法,Chour-Fasman 方法和 Karplus-Schulz 方法预测蛋白质的二级结构,各方案参数意义见文献^[4-8]。

方法和 Karplus-Schulz 方法的预测结果并不完全一致。Gamier-Robson 方法预测结果见图 2 和表 1,Chour-Fasman 方法预测结果见图 3 和表 2,Karplus-Schulz 方法预测结果见图 4。Karplus-Schulz 方法提示 VP2 蛋白有多个柔性区域,便于形成多个抗原表位。

2.2 VP2 蛋白的亲水性、表面可及性、抗原指数分析结果 按 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水性标准分析 VP2 蛋白的亲水性区域,预测结果见图 5;按 Emini 方案分析 VP2 蛋白氨基酸残基位于蛋白质的表面可及性,预测结果见图 6;按 Jameson-Wolf 方案预测 VP2 蛋白序列中抗原表位可能性较高的区段,预测结果见图 7。

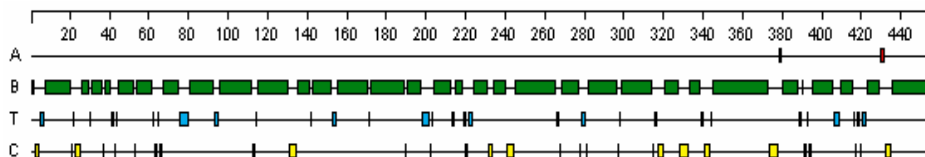


图 2 按 Gamier-Robson 方法预测的 VP2 蛋白二级结构
A: α -螺旋区段;B: β -折叠区段;T:转角区域;C:不规则卷曲区域

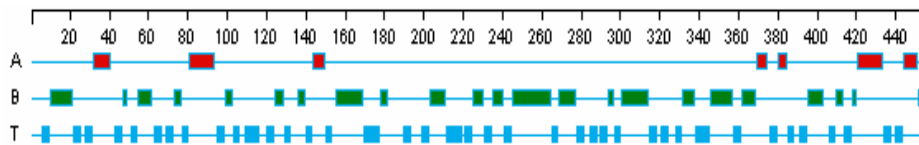


图 3 按 Chour-Fasman 方法预测的 VP2 蛋白二级结构
A: α -螺旋区段;B: β -折叠区段;T:转角区域

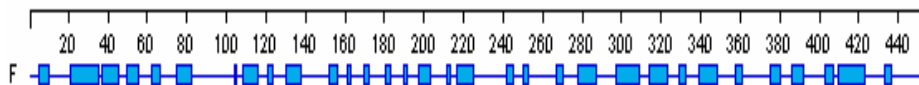


图 4 VP2 蛋白的柔性区域
F:柔性区域

表 1 按 Gamier-Robson 方法预测 VP2 蛋白的二级结构

α helix regions	β sheet regions	Turn regions	Coil regions
379, 430-431	1-2, 8-20, 26-29, 31-36, 38-40, 45-52, 54-61, 67-75, 81-92, 96-112, 115-130, 135-141, 143-152, 155-170, 172-189, 191-197, 204-212, 215-218, 224-231, 234-240, 245-265, 269-277, 282-296, 299-314, 321-327, 333-338, 345-373, 380-388, 390, 395-405, 410-415, 423-429, 436-453	5-7, 23, 30, 41-42, 44, 62, 65, 76-80, 93-95, 114, 142, 153-154, 171, 198-201, 203, 213-214, 219-220, 222-223, 266-267, 279-280, 298-299, 316-317, 339-340, 345, 390, 393-394, 406-409, 416-417, 418-419, 421-422, 454	3-4, 21, 23-25, 37, 43, 54, 63-64, 66, 113, 131-134, 190, 202, 220-221, 232-233, 241-244, 268, 278, 281, 297, 315, 317-320, 328-332, 341-343, 374-378, 391-392, 418, 420, 395, 432-435

表 2 按 Chou-Fasman 方法预测 VP2 蛋白的二级结构

α helix regions	β sheet regions	Turn regions
32-40, 81-93, 144-149, 369-374, 380-384, 421-433, 444-451	10-21, 47-49, 55-61, 73-76, 99-102, 124-128, 136-139, 155-169, 178-181, 203-211, 225-230, 235-240, 245-264, 269-277, 294-296, 301-314, 332-337, 346-357, 362-368, 395-403, 410-413, 418-420, 452-454	6-9, 22-26, 28-32, 43-46, 51-54, 63-66, 69-72, 77-84, 95-98, 103-106, 109-116, 120-123, 129-132, 140-143, 150-153, 170-177, 190-193, 199-202, 212-219, 221-224, 231-234, 241-244, 265-268, 278-281, 285-288, 290-293, 297-300, 315-318, 321-324, 328-331, 338-345, 358-361, 376-379, 385-388, 391-394, 406-409, 414-417, 434-437, 440-443

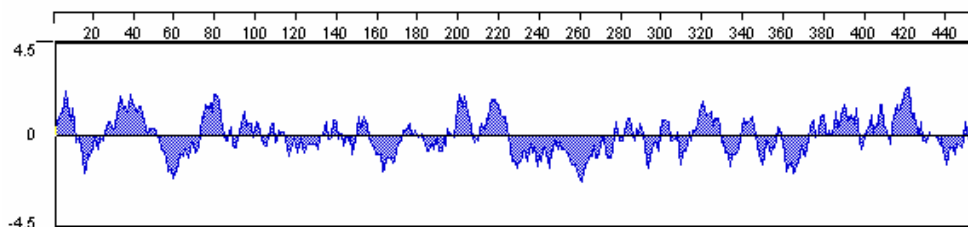


图 5 VP2 蛋白的亲水性分析

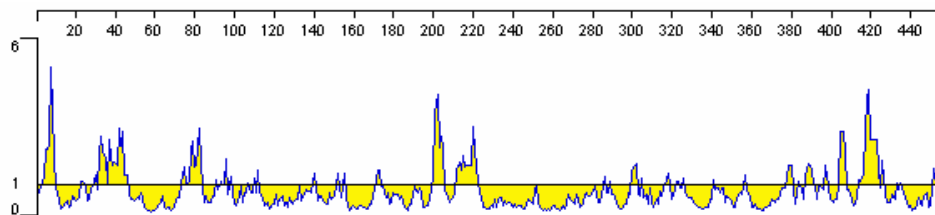


图 6 VP2 蛋白的表面可及性区域

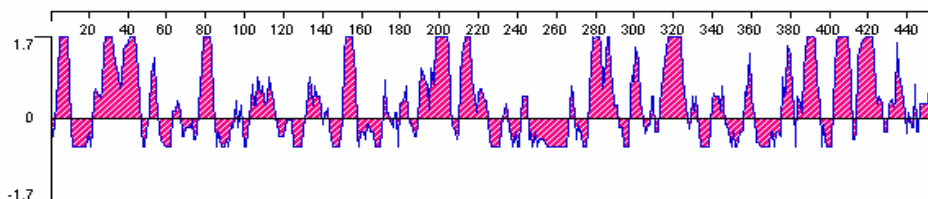


图 7 VP2 蛋白的抗原指数

2.3 Kolaskar-Tongaonkar 方法对 VP2 蛋白抗原表位指数的分析结果 应用 Kolaskar-Tongaonkar 方法预测大于 7 个氨基酸的 VP2 蛋白的抗原表位, 平均抗原指数为 1.033。抗原表位指数分析结果见图 8。

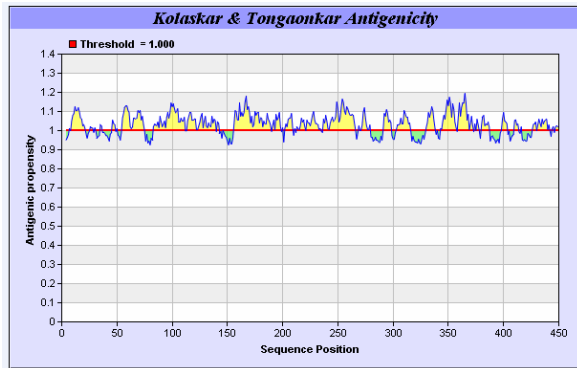


图 8 Kolaskar-Tongaonkar 方法对 VP2 蛋白抗原表位指数的分析结果

2.4 VP2 蛋白的 B 细胞表位预测结果 综合分析以上 VP2 的蛋白序列的亲水性指数、蛋白质表面可及性指数等抗原表位参数以及抗原表位指数预测结果, 如果某一氨基酸区段中: 抗原指数 ≥ 1.033 , 亲水性指数 ≥ 0 , 氨基酸的抗原表位可能性指数 ≥ 1 , 同时其内部或附近又具有柔性结构, 则这一区段为抗原表位的可能性较大。从符合这些条件的氨基酸区段中筛选出 13 个区段并对氨基酸长度适当修改作为备用的抗原表位, 序列如表 3。

表 3 预测 VP2 蛋白 B 细胞表位的肽段位置

序号(NO.)	B 细胞抗原表位序列	氨基酸位置
1	NLQDQTQQ	3-10
2	DDTLEKHTLRSETSTY	30-45
3	NGNYKFDQ	77-84
4	NINDKIGN	150-157
5	CDSSDRPRVY	197-206
6	ADDYQFSSQYQP	211-222
7	SDNGLTAGTDN	278-288
8	PTNEITQ	297-303
9	SKSGGQAGDQM	315-325
10	PNPELAK	375-381
11	EYGRFDPGA	386-394
12	SERDRLGK	403-411
13	PTREYTDREY	415-425

3 讨论

表位(epitope)是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团。在免疫应答中, 抗原分子表面的 B 细胞表位和 T 细胞表位, 分别被 B、T 细胞表面的 BCR 和 TCR 识别, 从而诱导产生高度特异性的体液免疫和细胞免疫, 产生免疫效应。因此, 理想的疫苗, 在设计上要同时考虑 B 细胞表位和 T 细胞表位, 尽量减少与免疫反应无关成分, 以减少疫苗的不良反应。抗原表位的确定不仅可以了解抗原的结构与功能、抗原抗体反应等有关免疫反应的众多信息, 而且对诊断试剂研发、药物合成和疫苗设计等也具有指导意义。常规确定抗原表位的方法大多操作繁琐、难度较大, 效率非常低。而利用生物信息学的技术方法对目的蛋白质的优势抗原表位进行预测分析, 可预先对表位疫苗进行设计, 以减少研究的盲目性, 并为蛋白特征分析及抗病毒免疫反应机制研究等提供理论依据。

自亲水性参数用于预测抗原表位以来, 随着分子免疫学与免疫信息学的发展, 现在已有多种方法用于 B 细胞表位的预测, 主要的参数有二级结构、亲水性、表面可及性、抗原性以及柔韧性等。应用单参数预测模型, 均有成功预测某种蛋白类型抗原表位的报道。但单参数预测有其局限性, 就亲水性和可及性而言, 虽然二者是形成表位的首要条件, 但其并不能表示一定具有抗原性。决定表位是否具有抗原性尚需多种因素的参与, 表位的形成是多种因素综合作用的结果。蛋白质的二级结构对抗原表位有很大影响。

法氏囊病毒蛋白质抗原表位的预测工作对于法氏囊多肽疫苗的合成, 诊断试剂的制备和单克隆抗体的筛选等, 都具有重要意义。用多种方法和多参数的综合预测抗原表位可以提高预测的准确性。本研究综合分析多种参数, 以提高 VP2 蛋白 B 细胞表位预测的准确性。采用 Garnier-Robson 方法, Chou-Fasman 方法和 Karplus-Schulz 方法预测蛋白质的二级结构, 三者预测的 α 螺旋、 β 折叠及柔性区域的共同区段, 形成这些结构的可能性大。蛋白质的二级结构对抗原表位有很大影响。 α -螺旋、 β -折叠的化学键键能比较高, 能够较牢固地维持蛋白的高级结构, 但很难合适地与抗体嵌合, 且经常处于蛋白质的内部, 因而很少可能成为抗原表位所在区域。而 β -转角及无规卷曲等柔性

结构则比较松散,易于发生扭曲、盘旋并展示在蛋白的表面,成为抗原表位的可能性较大。综合考虑蛋白质二级结构的影响和各种方案预测结果,提示 VP2 蛋白 N 端 3-10、30-45、77-84、150-157、197-206、211-222、278-288、297-303、315-325、375-381、386-394、403-411、415-425 区段可能是 B 细胞表位的优势区段。

本文综合比较分析二级结构、亲水性、表面可及性与抗原性指数等多种参数,预测了法氏囊病毒 VP2 蛋白可能的 B 细胞抗原表位,为该蛋白单克隆抗体的制备及表位疫苗设计奠定了可靠的理论基础,也为研究蛋白特性及机体抗病毒免疫反应机制提供了有利的工具。对于这几个预测的表位,本研究仅是利用免疫信息学技术进行初步筛选,最终应用效果必须用实验结果加以确认。

参考文献:

- [1] Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus infected cells[J]. J Gen Virol, 1995, 76(22):437-443
- [2] Yamaguchi T, Lwata K, Kobayashi M, et al. Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus[J]. Arch Virol, 1996, 141(8): 1493-1507.
- [3] Xianlan Cui, Hadya S. Nagesha, et al. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display[J]. J Virol Meth, 2003, 114(1):109-112.
- [4] Xianlan Cui, Hadya S. Nagesha, et al. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display[J]. J Virol Meth, 2003, 109(1):75-83
- [5] Wang X N, Zhang G P, Zhou J Y, et al. Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping [J]. Viral Immunol, 2005, 18:549-557.
- [6] Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(6):3824-3828.
- [7] Hopp T P. Retrospective:12 years of antigenic determinant predictions, and more[J]. Pept Res, 1993, 6(4): 183-190.
- [8] Saravanan P, Satish Kumar, Kataria J M. Use of multiple antigenic peptides related to antigenic determinants of infectious bursal disease virus (IBDV) for detection of anti-IBDV-specific antibody in ELISA-quantitative comparison with native antigen for their use in serodiagnosis[J]. J Immunolog Meth 2004, 293(7)61-70.

(上接第 18 页)

5 综合分析

5.1 受多方因素影响,2009 年土鸡种鸡企业经营情况不甚理想,甚至亏损,快大鸡种鸡企业经营平稳,但饲料价格不断上升直接影响其经营效益,从 2009 年底调查的种鸡存栏情况来看,土鸡种鸡存栏量减幅较大,快大鸡种鸡存栏量稳中有减,整体种鸡存栏量有所减少。大鸡行情低迷、饲料价格走高、投苗积极性较差等多个因素影响了种鸡企业的补栏积极性。预计 2009 年底至 2010 年第一季度,种鸡存栏数量、开产数量仍会维持在一个较低水平。

5.2 饲料价格不断上升使肉鸡生产成本增加,且当前肉鸡行情低迷,预计肉鸡行业各个相关企业的经营行为都趋于保守。未来饲料价格走势将直接影响包括种鸡企业、养殖企业和散养户的经营心态,从而影响 2010 年上半年的肉鸡行情。

5.3 2009 年的低迷行情继续清退部分竞争力较弱的养殖户,肉鸡养殖业进一步向一体化靠拢,行

业发展也渐趋成熟,相互之间的交流也越来越频繁,行业间会形成相互促进的良好局面;种苗企业、饲料企业迫于经营压力,进入到养殖行列,社会养殖量在下一阶段仍将保持较大的数量。

5.4 肉鸡消费中的品种结构变化值得关注。目前市场中主流的消费品种是以土鸡为代表的高档鸡,快大类肉鸡消费已退居第二,另外土 2 项、麻黄鸡、白鸡等品种在市场上逐年增多。不同日龄上市的肉鸡与品种之间影响更加紧密,肉鸡行情走势受到更多因素的影响。

综合各方面因素,预计 2010 年上半年肉鸡价格行情较 2009 年下半年理想,1 月到 2 月行情逐步向上,春节后会有小幅回落,第二季度会先上行后下走。上半年处于冬春之际,春节、五一等节日都能有效拉动肉鸡消费,寒冷天气也能促进肉鸡消费,整体肉鸡行情预计向好。从品种来看,预计快大类肉鸡价格稳中走弱,土鸡等高档鸡行情较好,竹丝鸡可能走出一路下滑的行情。

PRRSV 高致病性毒株 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立

赵泽坤, 王 娇, 王金凤, 张岭岭, 孙继国
(河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 根据 GenBank 中已发表的 PRRSV 的 NSP2 基因序列, 设计一对特异性引物。针对经典型毒株与高致病性毒株, 采用 RT-PCR 方法扩增, 可分别扩增出相应的 576bp, 486bp 的目的片段。从而在检测 PRRSV 的基础上, 进一步区分 PRRSV 的经典型和高致病性毒株。通过对扩增条件的筛选, 成功地建立了猪繁殖与呼吸综合征经典型与高致病性毒株的 RT-PCR 鉴别诊断方法, 且为 PRRSV 分离株的鉴定分型及 NSP2 功能研究奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; NSP2; RT-PCR; 鉴别诊断
中图分类号: S856 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2010)02-0036-03

Development of a RT-PCR method for the differentiation and identification of the highly pathogenic PRRSV

Zhao Zekun, Wang Jiao, Wang Jinfeng, Zhang Lingling, Sun Jiguo
(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: A pair of primers was designed based on the NSP2 sequences of PRRSV published in GenBank for the differentiation and identification of classical PRRSV strains and highly pathogenic PRRSV strains. Using RT-PCR method a fragment of 576bp or 486bp could be amplified for classical PRRSV strains or highly pathogenic PRRSV strains respectively. So the differentiation and identification of classical PRRSV strains and highly pathogenic PRRSV strains could be done. The RT-PCR method lay a foundation for the differentiation and identification of PRRSV strains and the research on the NSP2 function.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome; NSP2; RT-PCR; differentiation and identification

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)属动脉炎病毒科成员,可引起怀孕母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道症状^[1,2]。PRRSV自1987年在美国被发现以来,已迅速传播到世界各个养猪业国家和地区^[3],给养猪业造成了巨大经济损失。我国1996年首次在流产的胎猪中分离到 PRRSV,目前已出现多种变异株^[4]。

检测 PRRSV 感染的方法已有多种,包括病毒分离、抗原检测和抗体检测等^[5]。这些检测方法比较费时费力,而 PCR 作为一种新的检测方法具有高度特异、敏感和简便的优点。本研究通过对 PRRSV NSP2 包含缺失区在内的部分基因进行扩增,建立 PRRSV 快速准确的诊断方法,以预防和控制 PRRS 的流行。并且通过对扩增的 NSP2 基因条带大小不同来区分 PRRSV 的经典型与高致病性毒株,为 PRRS 病毒的变异分型及 NSP2 功能研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 病毒株和细胞株 PRRSV、PCV2 毒株由本实验室保存;CSFV、PPV、PRV 参考毒株购自中国兽药监察所。

1.2 主要试剂 Trizol 试剂、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化有限公司;Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;PMDTM19-T 载体、DNA Marker V 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物的设计与合成 PRRSV 引物根据 GenBank 已发表的序列,应用 DNAS^{TAR} 软件对 PRRSV 的 NSP2 基因进行多序列比对和同源性分析,应用 Primer5.0 软件对其保守区设计一对引物。引物由北京三博远志公司合成。其序列为:

P1 5'-CTTAAAGACCAGATGGAGGAGG-3'
P2 5'-CTGTGAGGACGCAGACAAATC-3'

1.4 PRRSV cDNA 模板的制备 取 PRRSV 经典

型和高致病性毒株的病毒液按 TRNzol Total RNA Reagent 总 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒基因组总 RNA, 将提取的病毒 RNA 反转录成 cDNA。cDNA 产物保存于 -20°C 备用。

1.5 PCR 扩增 在 $50\ \mu\text{L}$ 反应体系中加入 $10\times$ Buffer $5\ \text{mL}$, 混合 cDNA 模版 $4\ \mu\text{L}$, 上、下游引物 ($25\ \text{pmol}/\mu\text{L}$) 各 $1\ \mu\text{L}$, $10\ \text{mmol}/\text{L}$ dNTP $4\ \mu\text{L}$, $25\ \text{mmol}/\text{LMgCl}_2$ $2\ \mu\text{L}$, 加 Taq 酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.5\ \mu\text{L}$ 后用灭菌的双蒸水补至总体积 $50\ \mu\text{L}$ 。反应循环参数: 94°C 预变性 $5\ \text{min}$; 94°C 变性 $45\ \text{s}$, 50°C 退火 $45\ \text{s}$, 72°C 延伸 $1\ \text{min}$, 32 个循环, 循环结束后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$, 取出 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 PCR 产物的克隆、鉴定 纯化回收的目的片段与 T 载体连接, 转化感受点的 Top10, 纯化后提取质粒。将提取的质粒做 PCR 鉴定, 然后将鉴定阳性的重组质粒送交上海生工进行序列测定。

1.7 特异性试验 分别以 PCV2、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 的 DNA 或 cDNA, 作对照, 进行 PCR 扩增, 电泳, 观察结果。

1.8 PCR 反应条件优化

1.8.1 引物浓度优化 分别采取引物终浓度 $0.2\ \mu\text{M}$ 、 $0.35\ \mu\text{M}$ 、 $0.5\ \mu\text{M}$ 、 $0.65\ \mu\text{M}$ 、 $0.8\ \mu\text{M}$ 、 $0.95\ \mu\text{M}$ 6 个稀释度进行优化, 其它条件不变, 筛选能扩增出清晰目的条带的最低引物浓度。

1.8.2 Taq DNA 聚合酶浓度优化 分别采取 Taq 酶终浓度 $0.1\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、 $0.2\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、 $0.3\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、 $0.4\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、 $0.5\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、 $0.6\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、6 个梯度进行优化, 其它条件不变, 筛选出能扩增出清晰目的条带的最低 Taq DNA 聚合酶浓度。

1.8.3 dNTP 浓度 分别采取 dNTP 终浓度 $20\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ 、 $200\ \mu\text{M}$ 、 $300\ \mu\text{M}$ 、 $400\ \mu\text{M}$ 6 个稀释度进行优化, 引物及 Taq 浓度采用上述试验确定的浓度, 其它条件不变, 筛选出能扩增出清晰目的条带的最低 dNTP 浓度。

1.8.4 退火温度 按以上优化的条件, 退火温度采用 49°C ~ 52°C 梯度进行优化, 温度分别为 49.0°C 、 49.5°C 、 50.0°C 、 51.0°C 、 51.5°C 、 52.0°C , 筛选出目的条带最亮的为最佳退火温度。

1.9 敏感性试验 用紫外分光光度仪对阳性重组质粒进行检测, 然后将其作为模板进行 10 倍系列稀释, 分别按已优化的 PCR 反应的最佳条件进行 PCR 扩增, 以确定最小检测量。

1.10 重复性试验 以建立的 PCR 方法, 重复检

测 3 次, 以验证结果的可靠性。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 以 PRRSV 的经典型毒株和高致病性毒株的 cDNA 为模板进行扩增, 结果见图 1。经典型毒株和高致病性毒株均扩增出 1 条清晰条带, 大小分别与预期的 $576\ \text{bp}$ 、 $486\ \text{bp}$ 结果相符。

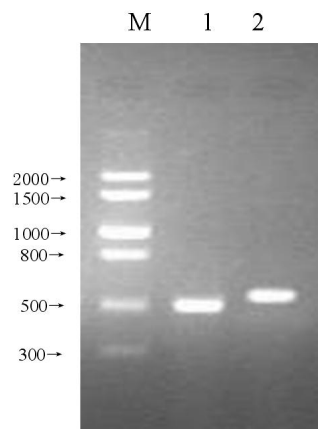


图 1 PCR 扩增结果

M: Marker V 1: 高致病性毒株 NSP2 2: 经典型毒株 NSP2

2.2 PCR 产物的克隆、鉴定结果 对 PRRSV 的经典型毒株和高致病性毒株的 NSP2 基因重组质粒进行 PCR 鉴定, 结果见图 2。经典型毒株和高致病性毒株分别得到 $576\ \text{bp}$ 、 $486\ \text{bp}$ 的目的片段, 与预期片段完全一致。应用 DNASTar 软件将测序结果与参考的毒株进行比对, 相似性分别为 98%、99%。说明测序产物分别为经典型毒株和高致病性毒株的 NSP2 基因的特异性条带。

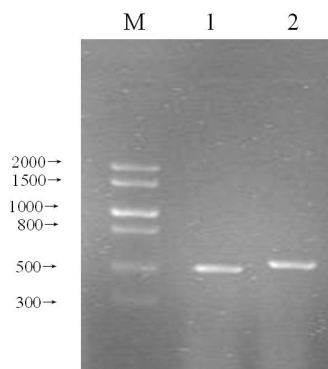


图 2 PRRSV NSP2 基因重组质粒 PCR 鉴定结果

M: Marker V 1: 高致病性毒株 NSP2 2: 经典型毒株 NSP2

2.3 特异性试验结果 按已优化的 PCR 反应条件, 分别以 PCV2、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 为模板, 进行 PCR 扩增, 结果除 PRRSV 外未扩增出任何条带, 表明此方法特异性好。

2.4 PCR 反应条件的优化 能扩增出清晰目的

条带的最低引物浓度为 $0.2 \mu\text{M}$, 最低 dNTP 浓度为 $100 \mu\text{M}$, 最低 Taq 酶浓度为 $0.3 \text{ U}/\mu\text{L}$, 目的条带最亮的退火温度为 51°C 。

2.5 敏感性试验结果 按已优化的 PCR 反应条件, 该 PCR 方法最低能检测到 PRRSV 20.25 ng/L 的核酸模板, 表明该法具有较高的敏感性。

2.6 重复性试验结果 对一份 PRRSV 阳性病料重复检测 3 次, 其结果均一致。

3 讨论

PRRSV 各分离株间基因组存在广泛的变异。其中以 NSP2 和 ORF5 基因的变异最大^[5], 尤其是 NSP2 基因。自 2006 年爆发“高热病”以来分离的毒株都有 30 个氨基酸的缺失。本研究通过对 NSP2 高变区部分基因的扩增, 根据电泳时片段大小的不同, 可以区分 2006 年以前流行的经典型毒株和近几年爆发的高致病性毒株, 从而为 PRRSV 毒株的变异、流行病学调查研究奠定基础。

在 RT-PCR 检测方法的研究中, 引物设计至关重要。由于在 PRRSV 基因组中 NSP2 基因变异较大, 所以在设计引物时, 在缺失区的两端需要找到高度保守区, 以保证引物的特异性。扩增的目的片段不应太大, 因为两条目的片段只相差 90 bp, 所以扩增的片段应越小越好, 以便于琼脂糖凝胶电泳分辨。本实验设计的引物, 针对经典型与高致病性毒株能分别扩增出 576 bp、486 bp 的目的条带, 在琼脂糖电泳时能直观的区分开两条目的条带。

RT-PCR 扩增时, 反应体系中各组份的浓度及

反应条件直接影响试验效果。并非各组份的浓度越大越好, 例如 dNTP 的浓度达到 $400 \mu\text{M}$ 时就抑制 PCR 扩增。因此, 在 RT-PCR 扩增前需对 PCR 扩增的各种反应条件进行优化。本实验通过对引物浓度、Taq DNA 聚合酶浓度、dNTP 浓度、退火温度及反应程序的优化, 最终确定能扩增出清晰的目的条带的各组份最低浓度及最佳退火温度和反应程序。

在本研究中, 建立的 RT-PCR 快速检测技术具有灵敏、特异和快速等优点, 可以及早对猪繁殖与呼吸综合征爆发做出准确快速诊断, 防止疫情蔓延, 可以将 PRRSV 感染猪迅速从猪群中筛查出来并予以清除; 并且能够利用扩增的目的条带大小不同, 鉴别出 PRRSV 的经典型与高致病性毒株, 从而为预防和控制我国 PRRS 的流行, 也对其流行病学调查提供一个很好的检测手段。

参考文献:

- [1] 孙庆申, 仇华吉, 童光志, 等. 猪繁殖与呼吸综合征单克隆抗体研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 22(4): 25-28.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. Vet Q, 1991, 13(3): 121-130.
- [3] Cheon D, Chae C. Antigenic variation and genotype of isolates of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea[J]. Vet Rec, 2000, 147(8): 215-218.
- [4] Anette. Diagnosis of PRRS[J]. Vet Microbiol, 1997, 55: 295-301.
- [5] MATEU E, DIAZ I. The challenge of PRRS immunology[EB/OL]. Vet J, <http://www.sciencedirect.com>, 2007-07-20.

2010“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 2010 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 2011 年第 1 期公布。

- 1、**评选范围:** 本刊 2010 年度 1-6 期发表的文章。
- 2、**评选数量:** 优秀论文数篇, 分设一、二、三等奖。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。

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

二〇一〇年一月十六日

乳化复合液体维生素制备工艺的初步研究

栾明娜¹, 周玉武¹, 徐福亮¹, 陈大健²

(1. 青岛康地恩药业有限公司, 山东 青岛 266111; 2. 江苏省滨海县动物卫生监督所, 江苏 盐城 224500)

摘要: 对维生素口服溶液剂制备工艺条件进行了筛选, 并对所用乳化剂种类, 稳定剂用量和乳化温度进行考察。结果表明对方量的维生素采用 12.5% 的乳化剂 OP-10, 5% 的稳定剂, 乳化温度 60℃, 所制备的液体多维在 4~25℃ 下 12 个月内无沉淀析出, 外观颜色无明显改变, 表明本制剂所制定的工艺路线可行, 适合大批量生产。

关键词: 液体维生素; 微乳; 制备工艺

中图分类号: S859.799.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0039-03

The preparation procedure for compound vitamins solution

Luan Mingna¹, Zhou Yuwu¹, Xu Fuliang¹, Chen Dajian²

(1. Qingdao KDN Pharmaceutical Co., Ltd, Qingdao 266111, China; 2. Binhai Animal Health Supervision Institute, Yancheng 224500, China)

Abstract: Factors including species of emulsifier, quantity of stabilizer and emulsifying temperature were studied to optimize the preparation procedure for compound vitamins micro-emulsion. The results showed that the optimization conditions were as follows: the concentration of emulsifier OP-10 was 12.5%, the concentration of stabilizer was 5%, and the emulsifying temperature was 60℃. There was no significant change in color and appearance, indicating that this method was suitable for mass production.

Key words: Liquid vitamin; micro-emulsion; preparation procedure

复合维生素中包含了 11 种维生素和氨基酸, 作为维生素和必需氨基酸的营养补充剂, 兽医临床主要用于维持家禽正常生理机能和增进新陈代谢等。目前应用的维生素制剂主要是传统电解多维, 即俗称的速溶多维, 为粉末状制剂, 通过饮水使用, 但溶解后易发生沉淀, 堵塞饮水器。乳化复合液体维生素通过微乳化技术克服了以上问题, 极大地改善了维生素在水中的溶解性和分散性, 尤其解决了脂溶性维生素的水溶性和吸收问题。已有报道^[1]证明脂溶性维生素经过水性化后, 能提高吸收率, 因而具有非常广泛的应用价值。

1 仪器与试剂

HJ-6A 多头磁力加热搅拌器, SL302N 电子天平, TG16 台式高速离心机, WD-A 药物稳定性检查

仪; 水溶性维生素原料药(青岛六和药业有限公司提供), 维生素 A 醋酸酯油 200 万 IU/g、维生素 D3 油 400 万 IU/g(饲料级, 厦门金达威维生素股份有限公司), 维生素 E 油 93%(浙江新和成股份有限公司产品), 乳化剂, 稳定剂, 硫脲, 苯甲酸钠、乙二胺四乙酸二钠等。

2 方法与结果

2.1 制剂处方及制备工艺 VA 油: 1 500 万 IU、VD₃ 油: 400 万 IU、VE 油: 4 000 mg、VK₃: 1 000 mg、VC: 5 000 mg、VB₁: 3 000 mg、VB₂: 2 000 mg、VB₆: 2 000 mg、泛酸钙: 5 000 mg、蛋氨酸: 1 000 mg、赖氨酸 1 000 mg 等。

避光条件下, 将苯甲酸钠 0.2 g、硫脲 0.1 g 和 EDTA-2Na 0.05 g 分散于适量注射用水中, 于

磁力搅拌器上保温至 50~60℃, 加入水溶性维生素和赖氨酸、蛋氨酸; 脂溶性维生素与乳化剂混合加热完全溶解后, 倒入上述水溶性维生素中搅拌 10 min; 加入稳定剂^[2], 搅拌混匀, 冷却后定容至 100 mL, 滤纸过滤后装瓶。

2.2 处方筛选及工艺优化^[3]

2.2.1 乳化剂的筛选 分别精确量取乳化剂与处方量的油性维生素充分混合, 搅拌并逐渐滴加蒸馏水, 观察混合物能否透明^[4]。结果见表 1。

表 1 乳化剂筛选结果

乳化剂类型	现象描述	结果判定
Tween80	透明, 较稀, 温度降低后变浑浊	× ¹⁾
Span80	透明, 粘稠, 温度降低后变浑浊	×
Tween20	透明, 较稀, 温度降低后变浑浊	×
OP-10	透明, 较稀, 温度降低后未变浑浊	√ ²⁾

1): “×”代表不可选; 2): “√”代表可选, 下同。

2.2.2 稳定剂用量的考察 将 2.2.1 节筛选出的乳化剂和稳定剂按照一定的质量比混合均匀后, 使用 2.2.1 节方法来检测形成纳米乳的稳定性, 于 4~25℃, 自然光照射放置一周。结果见表 2。

表 2 稳定剂的量筛选结果

乳化剂: 稳定剂	外观性状	结果判定
4:3	溶液显乳白色, 不能形成纳米乳	×
2:1	不稳定, 瓶壁上有乳白色析出物	×
2.5:1	橙黄色澄清透明溶液	✓
5:1	橙黄色澄清透明溶液	✓

2.2.3 乳化温度的考察 分别称取处方量的脂溶性维生素和乳化剂 OP-10 12.5 g、稳定剂 5 g 充分混合, 搅拌并逐滴滴加蒸馏水, 磁力搅拌器控温, 观察并记录形成透明纳米乳的温度区间。试验表明, 透明温度区间为 60~85℃, 低于 60℃均不能形成透明溶液。

2.3 微乳的质量评价

2.3.1 微乳的外观和形态 由于维生素 B2 的存在, o/w 型微乳外观上为橙黄色澄明均一液体, 于 254 nm 紫外线分析暗箱里可观察到黄绿色的荧光^[5]。

2.3.2 微乳及其类型的鉴别方法 采用 3 500

r/min 离心 10 min, 结果未见分层, 可判断为微乳, 能被水大量稀释, 为 o/w 型微乳。

2.3.3 微乳初步稳定性研究 将微乳制剂分别置于 -4℃、室温、60℃及光照条件下, 于第 5 天和第 10 天取样观察。在 -4℃、25℃条件下稳定, 无分层, 无沉淀析出; 在 60℃及光照条件下, 溶液外观颜色加深, 故需避光, 不宜高温储放。

2.3.4 稳定性试验 20 倍处方量称取原辅料按“2.1 方法”制备中试样品 3 批, 在室温条件下放置 3 个月, 观察是否分层、澄清晰度、VA、VD₃ 及 VE 含量变化。结果见表 3。其中 VA、VD₃ 及 VE 含量检测依据: 美国药典 29 版^[6]。定量结果表明, 室温放置 3 个月, VA、VD₃ 和 VE 化学稳定性良好。

表 3 三批中试样品稳定性检测结果

时间(月)	分层现象	无澄清晰度	VA 含量	VD ₃ 含量	VE 含量
0	无	澄清	102.4	99.9	107.8
1	无	澄清	100.5	100	105
2	无	澄清	99.4	99.6	99.5
3	无	澄清	95.6	99.1	97.7

3 讨论

微乳的粒径在 10~100 nm 范围内, 现在亦称纳米乳^[7]。纳米乳除了含有油相、水相和乳化剂外还含有辅助成分。纳米乳的乳化剂主要是表面活性剂, 其亲水亲油平衡值(hydrophile-lipophile balance, HLB)应在 15~18 的范围内, 乳化剂和辅助成分应占乳剂的 12%~25%。通常选用聚山梨酯 60 和聚山梨酯 80 等。制备时取一份油加 5 份乳化剂混合均匀, 然后加于水中, 如不能形成澄明乳剂, 可增加乳化剂的用量。如能很容易形成澄明乳剂可减少乳化剂的用量。因纳米乳乳滴小, 界面积大, 需要更多的乳化剂才能乳化。助乳化剂可插入到乳化剂界面膜中, 形成复合凝聚膜, 提高膜的牢固性和柔顺性, 又可增大乳化剂的溶解度, 进一步降低界面张力, 有利于纳米乳的稳定。

由于维生素 A 对紫外线不稳定, 且易被氧化, 而 Vitamin A Acetate 的化学稳定性比维生素 A 好^[8], 因此本研究选用维生素 A 醋酸酯油。维生素 E 对氧十分敏感, 遇光、空气可被氧化, 故应避光、密闭保存, 同时工艺中选用 CO₂ 饱和的注射用水以除

去空气中的氧。维生素 C 是强还原剂,不宜与氧化剂、重金属(特别是 Fe^{3+} 、 Cu^{2+}) 配伍,并应避光储存在非金属容器中。也因此处方中加入了抗氧化剂和金属离子络合剂。依据法国维克 Vitamino® Solution(胖维他红色水剂)和肉鸡在不同生长阶段对不同维生素的需求量拟定了本处方,该产品为禽类专用。由于复合维生素中含有 11 种维生素和氨基酸,而各种维生素的含量测定方法又不一,而且比较复杂,化学稳定性还在进一步研究中。

复合液体维生素作为一种营养添加剂,具有维持机体正常生理功能的作用,另一重要应用就是对颗粒饲料进行真空后喷涂。丹麦国家委员会于 1998 年用养猪生产试验证明了在颗粒饲料上添加液体维生素的优越性,他们比较了在膨化和制粒前加入固体维生素,或在制成颗粒饲料上喷洒液体维生素。实验结果显示,液体维生素回收率明显地高于固体形式^[9],这为液体维生素的推广

提供了新的应用前景。

参考文献:

- [1] 王彩彬. 液体多维素的特点[J]. 饲料工业, 1994, 15(4):16-17.
- [2] [英]R. C. 罗, [美]P. J. 舍斯基, [英]P. J. 韦勒编, 郑俊民主译. 药用辅料手册[M]. 北京:化学工业出版社, 2005. 598-600.
- [3] 吴旭锦, 欧阳武庆, 朱小甫, 等. 黄芩甙纳米乳的制备[J]. 精细化工, 2007, 24(5):470-472.
- [4] 徐辉碧. 纳米医药[M]. 北京:清华大学出版社, 2004. 105-107.
- [5] 中国药典委员会. 中国兽药典[S]. 一部. 北京:中国农业出版社, 2005. 230-231.
- [6] 美国药典委员会. USP29-NF24[S]. 2006. 2401-2402.
- [7] 崔福德. 药剂学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2004. 37-38.
- [8] 郑虎. 药物化学[M]. 第 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2003. 388-397.
- [9] 邝声耀. 液体维生素喷洒颗粒饲料的研究与应用[J]. 四川畜牧兽医, 2000, 27(8):42-43.

《兽医临床难病新解》简介

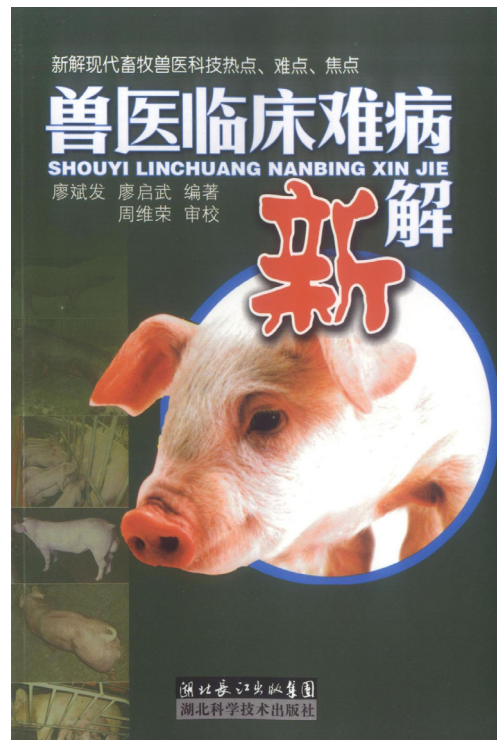
兽医临床工作者廖斌发、廖启武编著的《兽医临床难病新解》一书已于近期由湖北科学技术出版社出版,面向全国公开发行。

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、原虫病以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(含包装邮费)需要者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”。

联系电话:0728-4561354(兼传真)

手机:13872992321、13707222763



猪链球菌、巴氏杆菌二联四价灭活疫苗的研制

郭沈涛, 游启有, 杨 球, 以体强

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 采用链球菌 C 群、猪链球菌 2 型、巴氏杆菌荚膜 A 群、巴氏杆菌荚膜 B 群等强毒株, 经培养后灭活, 加氢氧化铝胶制成猪链球菌、巴氏杆菌二联四价灭活疫苗, 将制备的疫苗进行安全性及效力试验。结果显示, 制备的疫苗对猪、兔安全, 对小鼠 8/10 或以上保护, 对猪 4/5 或以上保护。表明制备的疫苗安全有效, 能够抵抗猪链球菌、巴氏杆菌强毒的攻击。

关键词: 猪链球菌; 巴氏杆菌; 灭活疫苗

中图分类号: S855.11

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0042-02

猪链球菌病是猪病中比较重要的传染病, 对猪危害严重, 可引起猪的败血症、脑膜炎、关节炎等症状^[1-3]。多杀性巴氏杆菌主要作为一种并发性、继发性感染因子, 广泛分布于所有畜群, 并且能很容易地从正常、健康动物的鼻腔和扁桃体中分离到, 当其和某一种产毒株同时存在时, 能引起畜群中大多数疾病的发生^[2]。两种细菌病的发病率近年来有逐渐增多的趋势。本课题组采用链球菌 C 群、猪链球菌 2 型、巴氏杆菌荚膜 A 群、巴氏杆菌荚膜 B 群强毒株, 经培养后灭活, 加氢氧化铝胶制成猪链球菌、巴氏杆菌二联四价灭活疫苗, 经实验室试用, 效果良好。现报道如下:

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 链球菌 C 群 C55138 株, 猪链球菌 2 型 SC-6 株, 巴氏杆菌荚膜 A 群 P71 株, 巴氏杆菌荚膜 B 群 C44-1 株, 均由中国兽药药品监察所提供。本试验采用的菌种均经敏感猪体复壮后保存。

1.1.2 培养基 链球菌培养基, 巴氏杆菌培养基, 均由青岛海博生物有限公司提供。

1.1.3 试验动物 18~22 g KM 系小鼠, 由广东省实验动物中心提供; 试验猪、兔, 由本公司动物场提供。

1.2 方 法

1.2.1 基础菌种的培养 将 C55138、SC-6、P71、C44-1 各菌株分别在鲜血马丁琼脂平皿上划线培养, 选取中等大小菌落, 用各自适宜培养基培养, 用作基础菌种。

1.2.2 制苗用菌液的培养 将各基础菌种分别按总量 1% 左右加进培养基中, 置 37℃ 中培养, 培养结束后, 无菌取样进行活菌计数及纯粹检验, 以确定培养菌数。

1.2.3 灭活检验 取样后, 在各培养瓶中加入 0.3% 甲醛溶液, 37℃ 灭活约 24 h, 按《兽用生物制品规程》^[4] 有关方法进行灭活检验。经检验合格后, 加 20% 的氢氧化铝胶进行浓缩。

1.2.4 菌苗分装 根据活菌计数结果, 将氢氧化铝胶沉淀液上清适量吸除, 以使每毫升含适量 C55138、P71、C44-1、SC-6 细菌苗。分装待用。

1.2.5 安全性试验 兔皮下注射灭活疫苗 2 mL/ 只, 猪肌肉注射灭活疫苗 5 mL/ 头, 观察 14 天。

1.2.6 效 力 试 验

1.2.6.1 对猪的免疫保护试验 用断奶后 21 天至 2 月龄健康易感猪 16 头, 分为 4 组, 每组 4 头, 肌肉注射灭活疫苗 2 mL/ 头 (含一个使用剂量)。21 天后, 每组连同条件相同的对照猪 4 头, 各注射致死量的 C55138、SC-6、P71、C44-1 强毒菌液攻击, 观察 10 天。

1.2.6.2 对 KM 系小鼠的免疫保护试验 用 18~22 g KM 系小鼠 30 只, 分为 3 组, 每组 10 只, 各皮下注射 0.3 mL 灭活疫苗。21 天后, 每组连同条件相同的对照鼠 10 只, 各注射致死量的 C55138、P71、C44-1 强毒菌液攻击, 观察 10 天。

1.2.6.3 免疫持续期试验 用断奶后 21 天至 2 月龄健康易感猪 64 头, 分为 4 组, 每组 16 头, 肌肉注射灭活疫苗 2 mL/ 头 (含一个使用剂量), 分

别在 3、6、9、12 个月, 每组连同条件相同的对照猪 12 头, 各注射致死量的 C55138、SC-6、P71、C44-1 强毒菌液攻击, 观察 10 天。

2 结果

2.1 数菌结果 培养结束后数菌, C55138 菌数为 17 亿 cfu/mL, SC-6 菌数为 21 亿 cfu/mL, P71 菌数为 25 亿 cfu/mL, C44-1 菌数为 23 亿 cfu/mL。

2.2 灭活检验 完全灭活, 符合《兽用生物制品规程》要求。

2.3 安全试验 免疫注射后, 兔在 14 天内健活, 注射部位仅有轻微炎症反应; 猪在 14 天内健活, 体温正常。

2.4 效力试验

2.4.1 对猪的免疫保护试验结果 攻毒后 10 天内, C55138 对照组 3/4 死亡, 免疫组 3/4 保护; SC-6 对照组 3/4 死亡, 免疫组 4/4 保护; P71 对照组 3/4 死亡, 免疫组 3/4 保护; C44-1 对照组 4/4 死亡, 免疫组 3/4 保护(表 1)。

表 1 对猪的免疫保护试验结果

组别	免疫组	对照组
C55138 组	3/4 保护	3/4 死亡
SC-6 组	4/4 保护	3/4 死亡
P71 组	3/4 保护	3/4 死亡
C44-1 组	4/4 保护	4/4 死亡

2.4.2 对 KM 系小鼠的免疫保护试验结果 攻毒后 10 天内, C55138 对照组 8/10 死亡, 免疫组 9/10 保护; P71 对照组 8/10 死亡, 免疫组 8/10 保护; C44-1 对照组 9/10 死亡, 免疫组 9/10 保护(表 2)。

表 2 对 KM 系小鼠的免疫保护试验结果

组别	免疫组	对照组
C55138 组	9/10 保护	8/10 死亡
P71 组	8/10 保护	8/10 死亡
C44-1 组	9/10 保护	9/10 死亡

2.4.3 免疫持续期试验结果 分别在疫苗免疫后的第 3、6、9 个月用强毒攻击, 猪均能获得较好的免疫保护效果。结果详见表 3。

3 讨论

猪链球菌病是由链球菌感染引起的猪败血性传染病, 主要引起猪的脑膜炎、胸膜炎、组织脓肿、关节炎等, 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, 各血清群间交叉免疫保护力不强。在自然界中, 链球菌 C 群的分布最广, 一直是我国链球菌病的重要病原^[6]。

表 3 不同免疫时间攻毒保护结果

组别	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月
C55138 组	3/4 保护	3/4 保护	3/4 保护	2/4 保护
SC-6 组	4/4 保护	4/4 保护	3/4 保护	3/4 保护
P71 组	3/4 保护	3/4 保护	3/4 保护	2/4 保护
C44-1 组	4/4 保护	3/4 保护	3/4 保护	3/4 保护

猪巴氏杆菌病又叫猪肺疫, 它是由特定血清型, 如荚膜 A、B、D、E、F 型多杀性巴氏杆菌感染所引起的急性或散发性和继发性传染病。

但在近年来, 由链球菌、巴氏杆菌引起的细菌性疾病混合感染越来越多, 使用疫苗进行预防的方法就显得很重要。所以疫苗的推广和使用很有现实意义。

本课题针对目前流行的猪链球菌、巴氏杆菌病, 选择流行较广的链球菌 C55138 株、猪链球菌 2 型 SC-6 株、猪多杀性巴氏杆菌荚膜 A 群 P71 株、猪多杀性巴氏杆菌荚膜 B 群 C44-1 株来制备疫苗。通过试验, 我们发现研制的猪链球菌、巴氏杆菌二联四价灭活疫苗安全有效, 能够抵抗同源强毒菌株的攻击。该疫苗的研制为预防猪链球菌、巴氏杆菌病提供一种新的方法, 具有临床应用意义。

参考文献:

- [1] Mazokopakis E E, Koftericlis D P, Papadakis J A, et al. First case report of Streptococcus suis septicaemia and meningitis from Greece[J]. Eur J Neurol, 2005, 12 (6): 4872489.
- [2] Barbara E, Straw, Jeffery J Zimmerman, et al. Diseases of swine[M]. 9th Edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford: 877-887.
- [3] Lopreto C, Lopardo H A, Bardi M C, et al. Primary Streptococcus suis meningitis: first case in humans described in Latin America[J]. Enferm Infect Microbiol Clin, 2005, 23 (2): 110.
- [4] 蔡宝祥, 肖传发, 徐为燕, 等. 实用家畜传染病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 1989. 251-258.
- [5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[S]. 2000 年版.
- [6] 苏良科, 陆承平. 马链球菌兽疫亚种中国株的类 M 蛋白基因抗原表位片段的克隆与表达[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (7): 6332636.

可吸收手术缝合线的研究进展

何理平, 吴端生, 陈新, 曹红峰

(南华大学实验动物学部, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 医用可吸收手术缝合线的研究是生物医用高分子研究中最活跃的领域之一, 已广泛应用于医学和动物医学的外科手术中。本文对几种天然及人工合成可吸收手术缝合线在体内的吸收情况、降解性能及研究状况进行了详细的阐述, 并对它们的优缺点作出了科学的评价。同时, 描述了我国可吸收手术缝合线研究现状。

关键词: 生物材料; 可吸收手术缝合线; 生物降解

中图分类号: S857.12*5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0044-04

医用可吸收手术缝合线是生物材料的一种, 它主要用于消化系统外科和整形外科等需要内缝合的手术中。它既能为机体提供暂时的支架或屏障, 又能在完成使命后, 通过降解成为机体可吸收的物质而消除, 避免体内因长期存在外来异物而产生炎症反应及其他一些不良影响, 同时也避免了二次手术^[1], 因而在医学及动物医学上, 它与其他手术缝合线相比具有明显的优势, 得到了广泛的应用, 是一种极具发展潜力的可吸收型植入材料。随着科技的发展, 人们对可吸收手术缝合线的研究越来越深入。很多学者^[2]认为, 理想的手术缝合线应满足下列条件: ①可以进行彻底的消毒杀菌处理; ②有一定的机械性能, 如适当的机械强度, 20%左右的延伸度, 有一定的柔软性和弹性回复, 有一定的湿润强度和摩擦系数; ③缝合、打结时操作方便, 作结后持结性能良好; ④缝合线在体内一定时间内保持一定的强度; ⑤对机体组织有适应性, 不致因异物反应而发生炎症; ⑥产品质量稳定可靠, 制作容易, 价廉易得。

目前, 在需要内缝合的外科手术中, 广泛采用的可吸收缝合线可分为天然可吸收缝合线和人工合成可吸收缝合线。前者主要有羊肠线、胶原纤维可吸收缝合线、甲壳素及壳聚糖可吸收手术缝合线等, 后者主要有聚乙交酯类缝合线、聚乳酸类可吸收缝合线、聚对二氧杂环己酮缝合线等。本文重点论述这些应用于体内的可吸收手术缝合线的研究进展情况。

1 天然可吸收缝合线

1.1 羊肠线

在所有天然可吸收缝合线中, 羊肠

线是最传统的一种。从最早的医学记录开始, 在外科手术中即已使用羊肠线, 它取自羊肠黏膜下层的黏膜加工而成。在体内的降解和吸收主要取决于给巨嗜细胞的活动提供能量的组织蛋白酶的存在情况。羊肠线至今仍是一般体内缝合线的材料, 因为它来源广阔且制作工艺相对简单, 成本低廉。但它存在柔韧性差, 组织反应大, 在消化液和感染环境下抗张强度耗损快等缺点。为解决这些缺点, 人们制作了掺有交联剂铬制成的铬肠线以及加碘制成的碘肠线, 前者可增加羊肠线的抗张强度和延长维持应力时间, 后者有减少切口感染率的可能, 但两者均未能完全避免羊肠线的上述缺点^[2]。

1.2 胶原纤维可吸收缝合线

胶原是从动物骨骼、筋腱中经浸煮、水解等多道工序提炼, 再经过加捻和交联剂的作用而制成的。胶原医用手术缝合线的研制, 取决于胶原的性质^[3,4]。应力-应变试验表明, 天然胶原表现出弹性态和粘弹态两个阶段的力学行为; 并且, 胶原的抗原性相当低, 具有天然可降解性, 并能促进细胞生长。胶原的这些性质使它成功地用来制备医用手术缝合线。用胶原纤维制作的^[5]可吸收缝合线有以下优点: ①可塑性好, 能加工成各种形状。②成纤性能好。挤压成形经拉伸后有一定的强度。③其制品有良好的组织相容性, 植入机体后无不良反应, 无毒性, 能被机体吸收。但根据郑淑芬^[5]报道, 胶原有吸收速率易变化的缺点。

温永堂等^[6]研究了胶原可吸收缝合线的制作, 他根据戊二醛与胶原蛋白结合的原理, 使用它作交联剂, 并探索了所作手术缝合线的强度与戊二醛的

浓度及戊二醛与胶原蛋白反应时的 pH 值、时间的关系, 这为以后人们研制新型手术缝合线提供了参考。胶原的吸收速率与它的强度有关, 为得到更高强度的缝合线, 从 1990 年起, 郭振友等^[7]开始了以胶原与氨基葡聚糖及其它天然混合材料为原料制作缝合线的研究, 他所研制的缝合线不仅保留了原有胶原缝合线可塑性好、成纤性能好、组织相容性好、植入无毒性的特性, 其强力大大高于胶原缝合线, 打结强力也达到或超过了美国药典所规定的指标。

1.3 甲壳素、壳聚糖可吸收缝合线 以甲壳素为原料制作可吸收缝合线始于 20 世纪 70 年代, 日本在该领域的研究处于世界前列, 著名的尤尼吉卡公司已有多项专利和产品问世^[8]。国内相关研究工作始于 90 年代。目前, 甲壳素缝合线的制作技术已较为成熟, 一般采用湿法纺丝工艺, 采用的原料多为高纯度的甲壳素粉末, 常用的溶剂有六氟丙酮、六氟异丙醇、三氯乙酸等。通过选择不同溶剂, 凝固剂, 改进纺丝和后处理工艺, 可制备出多种型号且能满足不同需求的可吸收甲壳素缝合线。

据有关学者的试验^[9], 甲壳素缝合线具有众多独特的优点: ①人体耐受性良好; ②具有一定的抗菌消炎作用, 能促进伤口愈合, 疤痕小; ③强度和柔韧性适中, 表面摩擦系数小, 易于缝合和打结; ④可进行常规消毒, 还可以进行染色, 防腐等特殊处理; ⑤植入后吸收均匀, 强度衰减速率适中, 能满足伤口愈合全过程对缝合线强度的要求; ⑥原料来源广, 加工简便, 成本低。Goosen 等^[10]的研究表明, 甲壳素缝合线对消化酶、感染组织及尿液等耐受性比羊肠线和 PGA 线要好。侯春林等^[11]进行的动物体内试验也充分表明了甲壳素缝合线的性能明显优于肠线。但目前甲壳素缝合线在临床上尚未大规模使用, 其主要问题在于拉伸强度与 PGA 类缝合线相比还有一定的差距, 还不能满足高强度缝合的需要; 而且在胃液等酸性条件下强度损失较快; 也有动物实验表明, 使用甲壳素缝合线在伤口愈合中期会出现原因不明的轻度炎症。为解决实际使用中的问题, 已有文献报道采用甲壳素衍生物制备缝合线^[12], 同时, 采用一些新的纺丝工艺, 如提高甲壳素液晶纺丝强度等, 可得到较好的效果。

苏秀榕等^[13]报道了从虾蟹壳中提取的壳聚糖制备医用外科可吸收手术缝合线的研究, 并将该缝合线同羊肠线在小白鼠体内进行了缝合实验。

通过组织切片, 电镜扫描观察, 证明了壳聚糖手术缝合线在机体内的吸收优于羊肠线; 并且通过实验证明了壳聚糖手术缝合线是无毒、无害、无任何副作用, 易打结、易被机体吸收的优良医用材料。

人类发现甲壳素及壳聚糖已有 100 多年的历史, 但将其用于制作医用手术缝合线还是近 30 年的事。从现有的研究成果看, 甲壳素及壳聚糖有着良好的应用前景。但目前投入临床使用的甲壳素和壳聚糖植入材料还非常有限, 究其原因主要是面临着三大困难: 一是制备工艺受限, 目前除将其溶于特定溶剂外, 尚无更有效的加工方法; 二是制品在植入后总不可避免带来原因不明的机体异常反应; 三是制品的降解速率受多种因素 (主要是酶) 的影响, 无法控制。

此后, 又出现了一种棕色海草为原料的海藻盐纤维, 这种海藻盐是由玫瑰糖醛酸和甘露糖醛酸组成的长链共聚物, 象一条锯齿状的细带。这种分子结构为海藻酸盐纤维提供了良好的性能, 使其具有高吸收性、止血性和组织亲和性等特点^[14]。海藻盐纤维的性质及开发利用正在研究之中。

综上所述, 在天然可吸收缝合线中, 因羊肠线的制作技术相对简单, 且沿用已久, 虽然存在不少缺点, 但在现在特别是在我国, 羊肠线的使用比例仍占有较大比例; 而胶原纤维可吸收缝合线, 虽抗原性很低, 但调节其吸收期长短的工作有待深入; 而目前, 甲壳素、壳聚糖的研究正是一个热点, 它的制作技术也已经成熟, 应用前景广阔。笔者认为, 如果甲壳素、壳聚糖要加工成更加优良的缝合线, 它的制作工艺及抗原性问题、降解速率问题的研究必须更加深入。

2 人工合成可吸收缝合线

近二三十年以来, 针对人们为了得到具有更高柔韧性、更高强度和为了满足不同的外科手术要求所需的具有不同降解性能的新的缝合线, 人们作了进一步的研究, 获得了具有较优异性能的可吸收手术缝合线。这类缝合线克服了肠线和胶原线的部分缺点, 具有断裂强度高、组织反应小和吸收作用好等优点, 因此得到了人们的极大重视。目前, 主要有以下几种人工合成的缝合线得到了美国 FDA 的批准, 可以上市, 因而它们的研究和应用较为广泛。

2.1 聚乙交酯类(聚羟基乙酸)缝合线 这是最

早商品化的一个品种。比较容易水解,且降解产物羟基乙酸是机体代谢的中间产物。这使它在发展体内可吸收缝合线的研究中被优先考虑,并于1962年被美国 American Cyanamial 公司开发,商品名为 Dexon。杜春麓^[15]报道,它的抗张强度超过肠线、棉线,与聚酯线相近,但组织反应比它小。Dexon 开始被吸收的时间随植入组织的不同而不同,一般在30~60天之间被吸收。有报道认为^[16],Dexon 的机械强度在体内的损耗较快,降解速率大,一般只适合于2~4周的外科手术。此缝合线具有均一性、稳定性和惰性,无毒性、无抗原性、无致癌性,能抗胃酸、胃消化酶和感染,组织反应极小。近10年来,作为体内可吸收生物材料,聚乙交酯分子工程进展主要体现在以下3个方面:①通过 μ -氧桥双金属烷基氧化物催化剂的活性开环聚合,成功合成了聚羟基乙酸酯/聚乳酸酯(PGA/PLA)的嵌段共聚物,从而扩大了这类材料的范围;②为提高材料柔韧性而适于制造的单丝外科缝合线;③发展了以聚羟基乙酸酯、聚乳酸酯为硬段、聚氧化乙烯(PEO)为软段的嵌段共聚物。

2.2 聚乳酸类(聚丙交酯)可吸收缝合线 聚乳酸(PLA)是一种具有优良的生物相容性和可生物降解的聚合物,经FDA批准可用作医用手术缝合线。据李孝红等^[17]报道:PLA在体内代谢最终产物是CO₂和H₂O,中间产物乳酸也是体内糖代谢的正常产物,所以不会在重要器官聚集。聚乳酸及其共聚物作外科缝合线,在伤口愈合后自动降解并吸收,无需二次手术^[18]。1975年,PLGA(LA/GA=90/10)开始作为手术缝合线投入市场。目前,在聚乳酸及其共聚物制作可吸收手术缝合线的研究中,仍有许多问题尚需解决。其中,寻找一种合适的催化剂是研究的重要课题^[19]。近年研究主要集中在以下几方面:①提高缝合线的机械强度,合成高分子量PLA,改进缝线加工工艺;②光学活性聚合物的合成。半结晶的PDLA、PLLA比无定形PDLLA具有较高的机械强度、较大的拉伸比率及较低的收缩率^[20],更适于手术缝合线;③缝合线的多功能化。例如,在缝合线中掺入抗炎药来抑制局部炎症及异物排斥反应。同时,如何使聚合物的降解速率与伤口愈合时间更好地相匹配,如何在缝合线中掺入抗炎药来抑制局部炎症及异物排斥反应等方面的研究工作还有待深入^[21]。

2.3 聚对二氧杂环己酮缝合线 此物质是Dexon和聚乳酸基乙酸之后的另一种可吸收缝合线,简称PDS。由于其分子链上有醚链,分子链柔韧性大,故可制成各种尺寸的单丝缝合线。PDS引起的组织反应小,单丝的抗张强度比聚酰胺和聚丙烯大,PDS在生物体组织中强度保留率大,对于缝合愈合时间较长的伤口特别有用^[15],但对于愈合较快的伤口来说,缝合线在失去支持作用时则成为组织的累赘。

20世纪80年代中期,ETHICON公司研制了对二氧杂环己酮与乙交酯的嵌段结晶共聚物缝合线,这种缝合线不但具有单丝缝合线结构上的优点,而且缩短了缝合线的吸收期,增加了线的柔韧性,扩大了聚对二氧环己酮的使用范围。其柔性和吸收性均优于对二氧环己酮均聚物。有人认为^[22],到目前为止,它是最好的可吸收缝合线。但是从文献报道^[23]来看,嵌段共聚操作难度大,工艺复杂,不易于工业化生产。因此,改进嵌段共聚操作技术的发展,将会大大弥补对二氧环己酮缝合线的不足,使其成为可吸收缝合线中的佼佼者。

2.4 乙交酯-三亚甲基碳酸酯共聚物缝合线 由乙交酯和碳酸三甲酯共聚所制成的手术缝合线在国外已开发成功,称为Maxon手术缝合线。它是由32.5%的三亚基碳酸酯与乙交酯聚合而成,可制成单丝缝合线^[23]。这种缝合线具有比聚丙烯和尼龙更高的结节强度和平直拉伸强度,它的组织反应小。据刘青^[24]报道,Maxon在体内的强度下降较慢,在28天时,Maxon仍可维持其原始强度的59%,并能在6~7个月内完全吸收。为了改善缝合线的操作性能,减少组织摩擦阻力等,可以对缝合线表面进行涂层和浸渍,这对缝合线在人体内的吸收速度和抗张强度的保留无明显影响^[25]。

以上几种是目前已经被美国FDA批准上市的手术缝合线,现在正在实验并待批准的还有聚酯酰胺、聚乙丙酯等。

总之,人工合成缝合线的研究将促进可吸收缝合线研究的发展。虽然这些合成材料优于天然可吸收缝合线,因为它们体内是通过水解降解成为无毒产物,并最终被组织吸收。但因合成技术较高,且分别存在各自的缺点(以上所述),其应用也受到了限制,特别是在我国,其批量生产的能力仍很低。但随着科学技术的发展,特别是生物技术

的突飞猛进,相信它们的缺点会得到解决,从而使它们在临床上的应用更加广泛。

3 我国可吸收手术缝合线研究状况

我国在这方面的研究已经起步,研究工作主要集中在聚乙交酯、聚乳酸酯等材料的合成及体外降解和动物实验。但到目前为止,这些研究工作大多只处于实验室阶段,尚有不少关键技术有待解决。目前国内医院使用的主要是羊肠线。对胶原纤维的开发、利用,我国已经起步,目前已有批量生产,但仍有许多问题尚未解决,如胶原纤维缝合线过早吸收的缺点。对壳聚糖、甲壳素缝合线原料的来源,笔者认为,我国海岸线较长,虾、蟹及其它甲壳素资源相当丰富,开发甲壳素资源,用来加工成手术缝合线和其他生物产品,具有很大的优势。但由于生产技术的限制,目前我国对甲壳素的开发利用还不太完善。而对人工合成的可吸收缝合线的研究,虽有些报道^[19,21,22],但实际生产的产品的质量与国外先进水平相比,仍有一定的差距。主要是质量不稳定,高档次的可吸收缝合线不能生产,应用也有一定限制。究其原因,主要是研究中面临三大困难:一是制备工艺受限,制品力学性能不尽如意;二是较为先进的可吸收缝合线大都价格不菲;三是提高聚合物的强度及解决植入后期反应和并发症等方面的问题必须深入研究。为解决上述问题,在我国大力进行这方面的研究是很必要的。目前,我们可采用各种方法,如考虑采用天然生物材料的衍生物或对其进行化学改性和表面处理以解决抗原性问题;同时可服用转移因子增强自身的免疫力^[26]。在我国,医用可吸收手术缝合线的研究正越来越受到广大研究者的重视,其研究领域也在不断扩大,目前人们正在寻找新的性能优良的材料,改进生产技术,以使其研究越来越接近世界先进水平。加快相关的研究开发工作有着重要的经济效益和社会效益。随着科学技术的发展和新的材料的不断发现及应用,医用可吸收缝合线必将成为一个充满生机和希望的研究领域。

参考文献:

- [1] 傅杰,李世普.生物可降解高分子材料在医学领域的应用(I)[J].武汉工业大学学报,1999,21(5):19-22.
- [2] 何理平,李文平,吴端生,等.肌腱缝合线植入家兔体内的组织病理学观察[J].实验动物科学,2008,(3):22-25.

- [3] 李培仁.胶原手术缝线[J].明胶科学与技术,2001,21(2):79-82.
- [4] 林玮,穆畅道,王坤余,等.胶原的性质及其在医药和化妆品工业中的应用[J].中国皮革,2001,30(15):8-11.
- [5] 郑淑芬,王素珍,辛银花,等.生物降解纤维在临床缝合线中的应用[J].生物学杂志,2001,18(1):34-35.
- [6] 温永堂,王东光,付振刚,等.胶原医用可吸收缝合线的研制[J].天津纺织工学院学报,1992,11(3):1-8.
- [7] 郭振友,温永堂,傅振刚,等.医用可吸收生物材料缝合线的研究[J].中国纺织大学学报,1999,25(2):89-93.
- [8] 胡巧玲,张中明,王晓丽,等.可吸收型甲壳素、壳聚糖生物医用植入材料的研究进展[J].功能高分子学报,2003,16(2):293-297.
- [9] 吴清基,刘世英,张敏.甲壳质缝合线的制备及研究[J].中国纺织大学学报,1998,24(5):18-22.
- [10] Goosen, Mattbeus F A. Application of chitin and chitosan[M]. Cancaster PA: Technomic Pub, 1997. 407-409.
- [11] 侯春林,顾其胜.几丁质与医学[M].上海:上海科学技术出版社,2001.36-75.
- [12] Modhaven P. Utilization of Prawn wests, Isolation of chitin and its conversion to chitosan[J]. Fish Technol, 1974, 11(1):50-53.
- [13] 苏秀榕,李太武,曾名勇.用壳聚糖制备可吸收性手术缝合线的研究[J].辽宁师范大学学报,1996,19(4):321-324.
- [14] 刘永莲,陈兵.缝合材料及其临床应用[J].中国医疗器械杂志,2001,25(2):99.
- [15] 杜春麓.医用功能纤维[J].现代纺织技术2000,8(3):58-62.
- [16] 汪忠稿,费立民.可吸收合成线—聚羟基乙酸线[J].中华外科杂志,1984,22(6):377-380.
- [17] 李孝红,袁明龙,熊成东,等.聚乳酸及其共聚物的合成和在生物医学上的应用[J].高分子通报,1999,21(1):24-30.
- [18] Pearce E M. Contemporary Topic in Plymer Science, 1997, 2:251.
- [19] 李良,李国明.聚乳酸的合成现状及在生物医学领域中的应用[J].安徽化工,2001,17(6):15-18.
- [20] Inouc Y, Kamci S. J Micromol Sci Purc Appl Chem, 1996, A322:787.
- [21] 史铁钧,董智贤.聚乳酸的性能、合成方法及应用[J].化工新型材料,2001,29(5):13-16.
- [22] 郭敏杰,刘振.聚对二氧环乙酮-乙交酯缝合线体外降解研究[J].高分子学报,2002,15(2):157-162.
- [23] 郭敏杰,刘俊.生物吸收性合成聚酯纤维晶体模型的描绘[J].天津轻工业学院学报,2003,18(3):31-33.
- [24] 刘青.国外医用缝合线的发展状况[J].国外医学生物学过程分册,1993,16(6):324-328.
- [25] Timmis M R, Lenz R W. Trends In absorbable suture [J]. polymer science, 1994, 2(1):15-17.
- [26] 何理平,吴端生,陈新,等.转移因子在动物疫病防治上的研究[J].中国动物保健,2009,(11):50-53.

浅谈 2 例术后急性喉头水肿

吴子峻, 戴 庶

(广州市立德动物诊所, 广东 广州 510630)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0048-02

喉头水肿的主要症状为呼吸加深、急促, 呼吸困难, 喉部出现特征性的呼哨音, 肺部出现广泛湿罗音并逐渐加重, 心率加快, 鼻腔流出淡红血性液体, 口腔粘膜变暗、发绀, 有大量的白色或粉红色分泌物流出, 血氧饱和度明显下降。抢救时通常采取以下方法: 立即吸氧, 连续检测血氧含量, 心率和呼吸, 并注意体温变化, 让动物尽快苏醒; 把犬的头部放低于肺部, 让喉部和肺部的液体顺利流出, 必要时把犬倒置并拍打胸廓, 加速液体排出; 紧急静脉注射地塞米松以减缓水肿, 肌肉注射扑尔敏抗过敏, 必要时可注射肾上腺素进行抢救, 情况持续, 严重时可以使用利尿药; 可考虑插入气管导管以保持呼吸顺畅, 呼吸停止时可以采用呼吸机帮助呼吸。

引起术后急性喉头水肿的常见原因有: 插气管导管的人员经验不足, 反复多次的强行插入(猫尤其明显), 会导致喉头损伤, 出血水肿, 在拔除气管导管后, 动物苏醒时血压上升, 水肿越发严重; 选择的气管插管型号过大, 机械压迫喉部诱发水肿; 在为气管导管充气时充气量过多, 诱发喉部水肿, 猫容易发生破裂; 在拔除气管导管时未预先将皮囊的气放出, 强行拔出损伤喉头, 导致出血水肿; 外用药物或污染物在麻醉时接触动物的咽喉部, 引起过敏反应。笔者在临床上曾碰到几例术后喉头水肿的病例, 现报告如下:

1 病例一

金毛寻回猎犬, 雄性, 3岁 40 kg, 因患鼻腔曲霉菌感染, 施行麻醉用克霉唑溶液灌洗鼻腔。手术过程选用气体麻醉, 异氟醚浓度维持约 2%, 心率保持 100~120 min, 血氧 93%~99%, 呼吸 6~12

min。前后共 40 min 情况良好, 手术顺利。在拔除气管插管 5 min 后, 突然出现血氧明显下降至 50%~80%, 心率加速, 喉部呼吸音粗粝, 听诊双侧肺部成湿性罗音, 鼻孔有泡沫液体流出, 舌头发紫, 口咽部有大量分泌物排出。立即打开口腔, 检查口咽部, 整个咽喉粘膜发红水肿, 表面有许多粘液。实施紧急吸氧抢救, 肌肉注射扑尔敏和地塞米松, 用干布擦拭口腔分泌物以防堵塞咽喉, 将犬只倒立(头下尾上)1 min 并拍打胸廓, 使液体从其鼻孔流出。反复以上操作多次, 密切监测血氧和心率, 约 30 min 后病情缓解, 狗完全苏醒, 分泌物慢慢减少, 喉头水肿情况改善, 2 h 后基本恢复正常。

分析本病例喉头水肿的原因, 估计是克霉唑溶液反流刺激咽部粘膜诱发的, 情况危急, 但由于发现及时和抢救得当, 水肿消退, 脱离危险。

2 病例二

曲架犬, 雌性, 9岁 16 kg, 因胸腹部皮下脂肪瘤施行切除术。该犬曾有 846 麻醉过敏史, 术前血常规检查和生化检查均正常。选用吸入式麻醉, 麻醉一直良好, 异氟醚浓度维持 2%~3%, 血氧 93~95%, 心率 110~130 min, 30 min 后手术顺利完成。停用麻醉药 10 min 后犬开始出现吞咽反射, 拔出气管插管。2 min 后呼吸急促, 喉部呼吸音粗粝, 血氧和心率难以测出, 肺部湿性罗音, 鼻腔流出泡沫性液体, 舌头及口腔粘膜发绀, 嘴鼻皮肤出现浮肿。打开口腔, 发现喉头有许多粘液, 粘膜水肿严重, 立即给患犬吸氧, 同时静脉注射地塞米松 10 mg, 肌肉注射扑尔敏 5 mg, 每隔 3~5 min 将患犬倒立 1 min, 防止喉头粘液进入气管引起堵塞。20 min 后患犬完全苏醒, 症状解除, 心率、

血氧饱和度恢复正常。

分析本病例, 因术前曾用阿托品, Rimidial 1.5 mL 止疼, 乙酰丙嗪 0.16 mL 镇静, 拜有利 1.6 mL 预防感染, 舒泰 1.6 mL 诱导麻醉并用 250 mL 生理盐水输液, 所以初步判断为药物过敏引起的急性喉头水肿。

3 小结

临床上, 麻醉的风险往往比手术本身还大, 这种风险给手术医生带来很大的压力。手术后发生喉头水肿的情况虽然并不多见, 但情况危急, 抢救不当动物将很快死亡。而这种风险往往发生在手

术完成以后, 往往容易疏于监护术后的犬只, 这时发生喉头水肿是非常危险且致命的。因此, 为防止类似的情况发生, 关键是在麻醉苏醒过程中, 医生不能远离病例, 要确保有专门助手看护, 只要发现及时抢救得当, 患犬是可以脱离危险的。所以我们对手术后的风险要有充分的认识, 动物在完全苏醒前必须有专人看护, 注意保温, 注意检测血氧饱和度, 心率及呼吸情况, 发现问题及时抢救。另外, 应注意与青霉素等抗生素过敏和异物性肺炎的鉴别诊断。

欢迎订阅

ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976 年创刊, 大 16 开本, 正文 52 页)

主管单位: 广东省农业科学院

主办单位: 广东省畜牧兽医学会、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

读者对象: 畜牧兽医行政管理人员、科研人员、技术推广人员, 大专院校师生, 种畜禽、兽药和饲料生产厂家技术人员, 基层畜牧兽医工作者和饲养专业户等相关人员。

订 价: 每期定价 5.5 元, 全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

电 话: 020-37245052、37288167

E-mail: gdxmsy@163.com

网 址: <http://www.gdaav.org/>

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

在巴布亚新几内亚坎德普地区的养猪经验介绍

饶仕军

(梅县动物卫生监督所, 广东 梅州 514700)

中图分类号: S813.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0050-02

笔者于2005年至2007年被中国政府选派援助南太平洋岛国巴布亚新几内亚, 作为一名畜牧专家, 在援助期间通过不断试验、摸索、总结, 为当地农民培育了一大批适合当地生长的优良猪苗, 现就如何培育猪种浅谈一下心得体会。

坎德普农业试验站是中国政府于1997年为巴布亚新几内亚独立国援建的, 旨在改善当地人民食物来源和增加收入。而养猪试验开始于2003年, 目的在于引进外来良种, 杂交优化本地猪种, 为当地人民提供适合本地生长的优质猪苗, 推动当地养猪业的发展。

坎德普地区地处巴新国高地五省, 位于东经143°, 南纬6°, 平均海拔在2 430 m以上, 全年平均气温约为14.8℃, 全年平均降水约为275天, 空气稀薄, 湿度大, 温度低。试验站座落在群山包围中, 不通电、不通邮、道路崎岖, 环境恶劣, 为开展养猪试验带来了一定困难。为切实有效地为当地人民提供适合本地生长的猪苗, 本试验站进行了如下试验:

1 品种的选择

通过引进杜洛克、长白、大白外来良种, 先后进行了纯外种三元杂培育和外来良种杂交本地猪种的试验。经过四年多的试养, 外来母猪和本地母猪共产仔300多头, 经观察、统计、比较, 初步发现含本地血统较高的外来良种与本地猪种杂交产生的三元杂商品代具有生长快、耐粗饲、抗病强、抗低温、饲料报酬高等优点, 特别是耐粗饲、抗低温优势更明显, 而纯外种三元杂则要求饲料营养水平高, 抗低温性能较差, 不适合当地环境的生长。

2 粗放型猪种的培育

由于本地区人民相对贫穷落后, 他们养猪主要靠放牧饲养, 猪的饲料来源主要是青草, 辅以极

少量番薯, 精料简直无从谈起, 所以当地农民需要粗放型猪种。面对这种情况, 本试验站有意识地加强了仔猪耐粗饲能力的培养, 在仔猪哺乳期补料时供给番薯、菜叶、鲜嫩的青草, 断乳后仔猪日粮中青饲料比例占40%以上; 同时, 增加仔猪放牧次数, 保证放牧时间, 仔猪出生后20 d开始放牧, 每周放牧次数达4天以上, 每次放牧时间超过2 h, 使本试验站提供猪苗更耐粗饲。

3 为克服恶劣环境采取的措施

3.1 防潮抗低温 由于坎德普地区全年降雨约275天, 平均每月22.9天。降雨有一定的规律性, 即大多数上午晴朗, 下午降雨。相对湿度每天呈规律性变化, 每天上午10时至下午2时, 相对湿度在60%以下, 下午4时到翌日早上8时, 相对湿度在95%以上。全年平均气温为14.8℃, 最低平均气温为9.8℃, 日夜温差约为10℃, 为使猪只健康成长, 我们采用如下办法:

3.1.1 猪舍设计 采取了有窗封闭式猪舍。在雨天及晚上关闭窗户, 在晴天敞开心窗, 使猪舍具有一定保温性能, 同时又保障猪舍的通风、换气。

3.1.2 帮助仔猪度过低温关。 由于本试验站不通电、晚上气温基本在10℃左右, 为了使新生仔猪能够安全度过低温关, 提高仔猪的成活率, 本站实行彩条布、麻包、干草三结合方式保温。用采条布密封产床, 缩小产房空间, 使产床小空间气温提高2~3℃; 仔猪睡的地方垫麻包, 仔猪活动的地方垫干草。经过采取以上措施, 仔猪成活率达95%以上。

3.2 克服饲料供应单一关 本试验站地处穷乡僻壤, 饲料供应不完全, 当地唯一可购买的只有简单的肉猪料, 日常培育无法按“饲料标准计划”。为了改善这种情况, 试验站因地制宜, 充分利用本站加

工小麦的副产品麦麸,自己种的各种蔬菜,自己养鸡产生的鸡粪。为满足怀孕母猪需要,本站还从中国购买一些鱼粉、钙粉、铁粉,尽量使各种营养物质达到均衡。

3.3 预防疾病的发生 由于本地湿度较大,故母猪容易犯风湿病和产后软瘫。为了使母猪减少此类疾病发生,一方面在清洁猪舍时尽量少冲水,勤打扫;

另一方面,加强了猪的放牧,让猪只到户外晒太阳,多运动,改善生理循环,同时补充微量元素。

通过畜牧专家们的努力,四年来本试验站为当地人民提供了300多头优质猪苗,优化了当地猪种,推动了本地区畜牧业的发展,增进了中、巴新人民的友谊。

我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。(信息来源:农业部网站)

亚洲象牙龈炎的诊断和治疗

蓝荣彬

(深圳市野生动物园, 广东 深圳 518055)

中图分类号: S853.58

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)02-0052-01

我园一母象不慎跌伤, 左侧獠牙从齿槽内摔断, 之后出现严重的化脓现象。经过半年多的精心治疗后康复。现将该病例的发病及治疗情况介绍如下:

1 发病情况

我园母亚洲象“果翁”, 1992年6月从缅甸购入, 年龄约18岁。2004年6月28日跌伤, 左侧獠牙在齿槽内摔断, 深度达33 cm, 同时口腔上腭摔裂缝长达8 cm。经检查: 大象的牙髓及齿槽化脓严重, 并有恶臭气味。而且大象的上腭(天然孔)及摔伤所致的8 cm长裂缝也被感染化脓, 獠牙的齿槽与上腭裂缝相通。当时我们采取局部清洗及肌肉注射等保守治疗法, 但效果不太明显, 化脓仍很严重, 颜色呈绿色。

2 实验室检查

2004年8月2日采取大象的耳静脉血送往深圳市南山区西丽医院做血常规及生化检查, 无菌采取牙龈内的分泌物送往南山人民医院做细菌培养和药敏试验, 鉴定结果为产酸克雷伯氏菌。

在采取静脉注射大量抗生素后, 取得一定的疗效, 但不如预期明显。所以2004年10月4日再次无菌采取牙龈内的分泌物, 送往南山人民医院做细菌培养和药敏试验, 鉴定结果为白假丝酵母菌。

3 诊断

根据症状结合实验室检查, 诊断该象是由于跌断獠牙后感染产酸克雷伯菌, 其后又感染白假丝酵母真菌, 致使牙龈发炎。我们按照药敏试验结果, 选择敏感药物进行治疗。

4 治疗

从2004年8月2日开始进行消炎治疗: 一是

静脉给药左氧氟沙星60 g加入5%葡萄糖4 500 mL, Vc25 g加入5%葡萄糖1 000 mL, 从耳静脉输入大象体内。二是口腔及牙槽清洗, 用双氧水和2%高锰酸钾水反复冲洗, 再用纱布粘庆大霉素和头胞曲松钠用探针送入牙槽。经过20多天的治疗后, 发现大象的上腭摔裂缝与獠牙齿槽相通处已有新肉芽组织长出, 上腭裂缝与牙槽相通处也长出新肉芽组织。伤口每天仍用药2次。

因2004年10月4日复检时发现真菌感染, 我们给母象静脉给药两性霉素B 100 mg/天, 连续静脉注射2周。同时给该母象口服大蒜精油35 g/天, 连续喂两星期, 以抑制真菌的滋生。一个月后检测分泌液, 未见细菌和真菌。至2004年底该母象痊愈。

5 讨论

5.1 鼻子是大象的采食、饮水工具并且长期在地上采食, 经常会触及污物, 造成上腭化脓并蔓延至獠牙牙髓, 经检验确定为感染了产酸克雷伯菌。

5.2 在对化脓创的治疗过程中发现白假丝酵母真菌与产酸克雷伯菌混合感染, 可能是由于较长时间使用抗生素, 导致真菌的滋生, 所以在大量使用抗生素的同时, 应饲喂大蒜素类药物以抑制真菌滋生。

5.3 此次大象摔伤比较严重, 抗生素用量大, 持续治疗时间也比较长。在治疗的不同时期, 我们根据伤口愈合的情况决定清洗次数。到中后期伤口长出了肉牙组织, 且肉牙组织比较嫩, 清洗过程中容易造成出血, 所以清洗伤口尤其小心。此时清洗伤口的次数改为2~3天一次。到后期则改为一周一次直至痊愈。

《广东畜牧兽医科技》征稿启事

《广东畜牧兽医科技》杂志是国内外公开发行的农业科学类学术期刊，统一刊号为 ISSN1005-8567、CN44-1243/S，双月刊，大 16 开本。办刊宗旨是展示畜牧业生产业绩和科研成果，传递最新畜牧科技信息，服务生产，促进学科发展。主要栏目有牧业论坛、专题综述、畜牧技术、兽医临床、试验研究、宠物园地、经验交流、信息之窗等。

1 征稿要求

本刊主要刊登畜牧兽医领域的原创性研究论文和临床生产经验，择优刊登阐述新观点、新方法、新概念的综述及专论。文稿内容应具有科学性、先进性、实用性，要求主题明确、文字精炼、数据准确、文理通顺。

2 文稿书写格式

2.1 文稿书写顺序 题目、作者(署名)、作者单位及所在地和邮编，摘要、关键词，中图分类号、文献标识码，正文、结论和参考文献。对于综述和研究类文章，需增加英文的题目、作者(拼音)、作者单位及所在地、摘要和关键词。

2.2 题目 文章标题应与内容贴切，一般不超过 20 字。必要时可加副标题。

2.3 作者署名及单位 书写格式参照以下范例。请在文末附第一作者及通讯作者的简介(包括姓名、性别、出生年月、学历或职称、主攻方向、通讯地址、联系电话及电子邮箱)；获得基金资助研究所产生的论文需注明基金项目名称及编号。例：

彭礼繁¹，罗光彬¹，李东全¹，陈自洪²，石德顺²

(1. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室，辽宁 沈阳 110161；2. 广西大学动物繁殖研究所，广西 南宁 530005)

2.4 摘要 摘要须充分反映论文的研究目的、方法、结果和结论，用第三人称方式书写(不使用“本文”、“作者”、“笔者”等作为主语)，不分段，不用图、表、公式和参考文献的序号。英文摘要应与中文摘要保持实质性内容的一致性。

2.5 关键词 一般选用 3~8 个能反映论文主要内容的单词或术语。

2.6 标题序号 要简明扼要、层次分明，要求用阿拉伯数字连续编号，如“1”、“1.1”、“1.1.1”等。各层次标题的序号均左顶格书写。

2.7 图表 图和表应具有自明性，切忌与文字表述重复。图表应简洁、规范、清晰、大小适中。表格一律用三线开放表，图和表的序号一律用阿拉伯数字编排，如图 1、图 2、表 1、表 2 等。

2.8 计量单位 采用国家法定计量单位。

2.9 参考文献 采用顺序编码制。在论文中按引用文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编序(上标形式)。文后参考文献按文章中引用的顺序排列，著录参考格式如下：

期刊：[1] 孙勇，赵永成，王继先，等. 环境镉暴露时人胎盘组织金属硫蛋白表达及其意义[J]. 中国自然医学杂志，2005，7(3):185-198.

专著：[2] 殷震，刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京：科学出版社，1997. 1148-1150.

学位论文：[3] 刘伟. 汉字不同视觉识别方式的理论和实证研究[D]. 北京：北京师范大学心理系，1998.

论文集：[4] 辛希孟. 信息技术与信息服务国际研讨会论文集：A 集[C]. 北京：中国社会科学出版社，1994.

文献类型标识：M- 专著，C- 论文集，N- 报纸文章，J- 期刊文章，D- 学位论文，R- 报告，S- 标准，P- 专利；对于不属于上述的文献类型，采用字母“Z”标识。

3 声明和约定

3.1 来稿一经刊用，将按规定支付稿酬(第一作者收，含著作权使用费)，并赠送样刊 2 本。

3.2 本刊已加入“中国学术期刊(光盘版)”、“中文科技期刊数据库”和“万方数据 - 数字化期刊群”，如不同意将文章编入上述数据库，请在来稿时声明。

3.3 来稿文责自负。编辑部对来稿有权作技术性或文字性修改，不同意删改的稿件请在来稿时声明。

3.4 请勿一稿多投，若 6 个月后未接到刊用通知者可改投他刊。来稿一律不退，请作者自留底稿。

3.5 来稿时请注明作者详细地址、邮政编码和联系电话，以便联系。

地 址：广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部

邮 编：510500

电 话：020-37288167

传 真：020-37245052

E-mail: gdxmsykj@163.com