

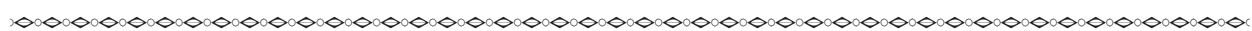
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Aug.2010 Volume 35,Number 4 (Total No.152)

Main Content

- The regulation of nervous system on liver function of mammals* Shan Haikuo, Fan Xiaolong, et al(3)
- Research progress on lysine requirement of lactating sows* Liu Caixia, Hu Youjun(5)
- Research progress on detection methods and subtyping methods on Swine Streptococcus*.....
.....Hong Weibin , Huang Yuhao, et al(9)
- Research progress on typing of Haemophilus Parasuis* Yu Xiaoli, Su Danping, et al(13)
- The effects of antibiotic peptide S807 on improving the production performance in broilers*
.....Lu Yu, Wang Suzhen, et al(17)
- Freezing technology of boar semen*Li Zhipeng, Chen Xinghong, et al(21)
- Etiology of respiratory diseases in nursery pigs and prevention to it*Li Zhongxing(24)
- Isolation and identification of one strain of Salmonella gallinarum in Linzhi area ,Tibet*
.....Lu Zhiping, Se Zhu, et al(25)
- Causal diseases caused by artificial insemination in breeding hens and prevention measures*.....
.....Wu Qunbin, Wang Ruibin, et al(27)
- Simple and rapid extraction method of goose blood genome DNA*.....Wu HuiYing, Liu You, et al(29)
- Disinfection of disinfectant "Baidikang" on Haemophilus parasuis*.....Leng Shuzhen, Huang Yuan, et al (32)
- Detection of Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum using duplex PCR method*.....
.....Li Min, Guan Fengxia, et al(34)
- Culture of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on Marc-145 cell microcarriers*.....
.....Mu Guanghui, Li Jiaai, et al(37)
- Internal fixation for canine pelvic fracture*Liao Danhua, Chen Yizhou, et al(41)
- Surgical therapy of perineocele in canine*Li Kaijiang, Mao Xinchun(43)
- Current state and improvement measures of animal welfare in China*Wan Shiping, Wang Hui, et al(46)
- Microbe contamination and prevention during cell cultivation* Chen Zheng, Lai Yuehui, et al(49)



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

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

Chief Editor: JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor: SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel: (020)37245052 37288167

Fax: (020)37245052

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

神经对哺乳动物肝脏功能的调节

剡海阔, 范小龙, 马勇江, 梁梓森, 邓衔柏*
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S853.54

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0003-02

肝脏是动物体内最大、功能很多的器官之一,它参与体内消化、代谢、解毒和免疫等过程。实验证明,动物在完全摘除肝脏后,即使给予相应的治疗,最多也只能生存 50 多个小时,这说明肝脏是维持生命活动的一个必不可少的重要器官。哺乳动物的肝脏具有丰富的神经,主要来源于腹腔神经丛和迷走神经的分支,它们随肝动脉到肝十二指肠韧带(HDLR)中行走组成肝丛,沿着肝血管和胆管经肝门入肝,分布于肝小叶间结缔组织内,并有神经纤维进入肝小叶内,分布于肝细胞和血窦的内皮^[1~2]。

肝脏的神经具有感觉和效应两种功能,如肝脏对渗透压的感觉调控作用和对糖原分解的调控作用;交感神经控制肝血管的舒缩、调节肝的血流量等^[3]。肝脏不仅其血管受自主神经支配,而且肝实质细胞和非实质细胞如 Kupffers 细胞、肝窦内皮细胞和 Ito 细胞等均受交感神经和副交感神经的支配^[4]。肝脏的交感和副交感神经对肝脏的糖代谢、血流动力学及肝细胞的增殖等都具有重要的调节作用。本文就神经对哺乳动物肝脏功能的调节作用做一综述。

1 交感神经对肝脏功能的调节

1983 年 Moghimzadeh 等^[5]用 Falck-Hillarp 荧光法观察到由门静脉及肝动脉分支到小叶间的血管上有肾上腺素能神经丛。围绕在血管上的神经纤维中有具有膨体的肾上腺素能神经纤维,这种神经纤维进入肝实质中形成小叶间神经网络。Metz 等^[6]对豚鼠的研究表明,许多肾上腺素能神经纤维完全到达肝小叶内,与肝细胞相联系,并且可能终止于中央静脉。从神经类型的形态学上来比较其它观察资料,可见这些神经拥有了感觉功

能和调节代谢及血管动力的作用。有人提出,肝脏的自主神经支配在本质上来说与心脏的神经支配有着一样的重要性。

1.1 对血流动力的调节作用 肝脏神经调节血流动力的功能是最明显的。最近日益增多的资料表明,肝脏的神经对门静脉血流动力的调节处于主导地位。在基础状态下,从门静脉到肝静脉间的巨大血压落差几乎被平均分配至从门静脉通过肝窦再到肝静脉的各级血管上。在这途中有足够的神经分布到门静脉系统、肝窦和肝小叶间静脉上。肝硬化时肝实质的神经分布异常可能是门静脉血流异常的原因^[7]。Kurosawa 等^[8]对麻醉的家兔活体研究表明,刺激肝脏交感神经可导致肝脏血流量降低,这同样说明交感神经的活动对肝脏的血流量具有重要的调节作用。

1.2 对糖代谢的调节作用 Shimaza 等^[9]在植物性神经对肝脏糖代谢的调节上作了系统的研究。他们发现刺激内脏大神经传出段时,可看到肝糖原磷酸化酶及葡萄糖-6-磷酸酶活性明显升高,随即血浆葡萄糖的浓度明显增高,肝糖原含量下降。Moghimzadeh 等^[10]对多种哺乳动物的活体肝脏进行了研究,发现刺激肾上腺素能神经纤维会使肝细胞释放的葡萄糖增加。

1.3 对肝细胞的调节作用 交感神经可以对肝细胞直接作用,也可以通过神经递质或通过血流动力学的改变进行间接作用。交感神经释放的去甲肾上腺素可以促进肝细胞的再生^[11]。Kiba 等人^[12]刺激下丘脑腹侧正中可以促进切除后肝脏的再生,并认为在肝细胞的增殖和程序性死亡中起着重要的调节作用。而 Iwai 等^[13]电刺家兔下丘脑腹侧正中,发现血浆中丙氨酸转氨酶活动明显加强,

但在肝脏中该酶的活动则降低。当外科去除肝脏的交感神经时,发现血浆中丙氨酸转氨酶的活动被抑制。由于下丘脑腹侧正中属于交感神经系统,因此同样证明了交感神经对肝脏再生能力的调控作用。

1.4 对胆汁分泌的调节作用 据 Beckh 等^[14]报道,刺激肝脏交感神经还可以影响胆汁的分泌。在肝动脉和门静脉附近安置一个铂电极,然后刺激肝脏神经(20V,20Hz,2ms),发现肝脏胆汁的流动、胆酸的分泌以及胆汁在肝门的流出均减少,并证明这种减少是通过 $\alpha 1$ 受体来实现的。

由此可以看出,交感神经对肝脏功能的正常发挥有着重要意义。它们通过与肝内血管之间的紧密联系,对肝脏的血流动力学进行着很大程度的调控;通过与肝细胞及胆管之间的联系,对肝脏的糖代谢、肝细胞的增殖以及胆汁的分泌等都进行着一定程度的调节。

2 副交感神经对肝脏功能的调节

迷走神经进入肝门区后分成很多分支,在肝包囊下随结缔组织稠密分布。直接进入肝实质的纤维形成稠密的神经丛,与肝细胞密切接触,最后一直到达肝小叶内部靠近中央静脉处。随小叶结缔组织走行的神经纤维产生很多分支,有的围绕在门静脉、肝动脉的分支和小胆管上,也有侧支穿入肝实质。

2.1 对糖代谢的调节作用 Shimazu^[15]在家兔上刺激左侧迷走神经,引起肝糖原合成增加而葡萄糖水平稍有降低。切除胰脏(排除胰脏激素的影响)后刺激迷走神经的效果仍保留 60%,说明迷走神经对肝有直接作用。同时,刺激与副交感神经有关的丘脑下部外侧核(LH)时,发现血糖水平降低,但肝糖原含量无明显变化。后来他又用脑内注射微量递质的方法进一步研究,发现 LH 中有对乙酰胆碱敏感的神经元,它们调节肝糖原合成酶的活性,即通过迷走神经激活肝糖原合成酶促进肝糖原的合成。据 Moore 等^[16]报道,刺激肝脏副交感神经可以缓解交感神经对肝脏葡萄糖吸收的抑制作用,从而使肝脏葡萄糖的吸收加强。Cardin 等^[17]报道,阻断迷走神经可以调节肝脏葡萄糖的产生,其原理是抑制了肝糖的分解。

2.2 对肝细胞的调节作用 副交感神经释放的

乙酰胆碱则对肝细胞的增殖具有抑制作用。Sakaguchi 等^[18]报道,家兔在切断肝脏迷走神经后,再将 66%的肝脏切除,通过测定肝细胞有丝分裂指数来评估肝的再生情况,发现肝细胞有丝分裂指数被抑制。这说明肝脏迷走神经对肝细胞的增生具有积极的调控作用。Kiba 等^[19]报道,在迷走神经高度兴奋状态下,鼠肝细胞凋亡显著增加。切断迷走神经及加用阿托品后则细胞凋亡不明显。然而 Hiramoto 等^[20]的研究则认为迷走神经能减少脂肪酸合成系统诱导的肝细胞凋亡。

总之,迷走神经对肝细胞的再生、肝脏的糖代谢同样具有重要的调节作用。它和交感神经相互依赖,相互制约,共同完成了对肝脏功能正常发挥的调节。

参考文献:

- [1] Timmermans J P, Geerts A. Nerves in livers: superfluous structures? A special issue of the anatomical record updating our views on hepatic innervation [J]. *Anat Rec B New Anat*, 2005, 282(1): 4.
- [2] Mann R, Bhathal P S, Bell C. Sympathetic innervation of the liver in man and dog: an immunohistochemical study [J]. *Clin Auton Res*, 1991, 1(2): 141-145.
- [3] 宋鹤九, 叶蒙福, 赵林昌, 等. 家兔肝的神经支配 [J]. *解剖学杂志*, 1993, 16(4): 353-355.
- [4] Ueno T, Bioulac-Sage p, Balabaud C, et al. Innervation of the sinusoidal wall: regulation of the sinusoidal diameter [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 280(1): 868-873.
- [5] Moghimzadeh E. Fluorescence microscopical and chemical characterization of the adrenergic innervation in mammalian liver tissue [J]. *Cell Tiss Res*, 1983, 230: 605-613.
- [6] Metz W, Forssmann WG. Innervation of the liver in guinea pig and rat [J]. *Anat Embryol (Berl)*, 1980, 160(3): 239-252.
- [7] Vom-Dahl S, Bode JG, Reinehr RM, et al. Release of osmolytes from perfused rat liver on perivascular nerve stimulation: alpha-adrenergic control of osmolyte efflux from parenchymal and nonparenchymal liver cells [J]. *Hepatology*, 1999, 29: 195-204.
- [8] Kurosawa M, Unno T, Aikawa Y, et al. Neural regulation of hepatic blood flow in rats: an in vivo study [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 321(3): 145-148.

(下转第 20 页)

泌乳母猪赖氨酸营养需要的研究进展

刘彩霞, 胡友军

(广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 泌乳母猪饲养是养猪生产的重要环节之一。由于现代母猪饲养管理方式和品种选育造成的基因型改变等导致其营养需要量也发生变化。赖氨酸作为泌乳母猪最重要的氨基酸一直得到营养学家的关注。本文综述了近20年来泌乳母猪赖氨酸的研究进展和实际条件下运用模型确定的赖氨酸需要量, 以期为实际生产服务。

关键词: 泌乳母猪; 赖氨酸

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0005-04

泌乳母猪饲养是养猪生产的重要环节之一, 其营养供给直接关系到养猪场的产仔数、仔猪成活率和母猪使用年限等生产成绩, 进而影响养猪经济效益。近二十年来, 经产母猪和初产母猪的管理已经历了重大变化: 初产母猪在月龄较小、体重较轻情况下配种, 哺乳期因乳猪断奶日龄提前而缩短到14日龄。同时, 为培育瘦肉型猪, 育种学家们一直在从事降低背膘厚度的选育工作, 导致母猪基因型发生变化, 使得成熟母猪体型较大和采食量较低。上述现代管理方式和基因型等的变化也直接导致母猪营养需要发生相应变化, 其中供给充足的、比例恰当的氨基酸营养是泌乳母猪饲养管理的关键所在。

以第一限制性氨基酸为标准, 确定饲料蛋白质和氨基酸的水平是运用理想蛋白质模式配制泌乳母猪日粮最核心的问题。赖氨酸(Lysine, Lys)是哺乳母猪的必需氨基酸之一, 也是玉米豆粕型日粮中的第一限制性氨基酸。泌乳期间, 总Lys用于维持需要的相对比例非常低, 绝大多数(98%)用于泌乳^[1], 由此可见Lys在泌乳母猪营养中的重要地位。如何准确地给哺乳母猪供应Lys, 使其发挥最大的生产潜力, 一直是许多养猪者关心的问题。本文将对泌乳母猪的Lys研究进展和实际饲料中Lys浓度的确定作一综述。

1 泌乳母猪Lys营养需要研究进展

上世纪九十年代, 国外已集中研究Lys对哺乳母猪生产与繁殖性能的影响, 而国内在这方面

的研究较少。2000年后, 部分学者围绕不同饲料Lys水平对仔猪断奶体重、哺乳母猪体况变化、发情间隔、体蛋白质分解率和窝产仔数的影响等方面开展研究, 但研究结果不一致。要确定哺乳母猪的Lys需要量, 不仅需要考虑母猪品种、胎次、体重、体损失、断奶仔猪数量及平均日增重, 还要考虑Lys水平对下一个周期的繁殖性能的影响, 因此研究周期长, 难度大, 因此对泌乳母猪的Lys需要研究较难开展。

Lys是泌乳母猪日粮的第一限制性氨基酸, 氮平衡实验和血浆尿素氮法都可以表明体内氨基酸尤其是第一限制氨基酸的动员状况, 因此均可作为测定泌乳母猪Lys需要量的指标。在泌乳母猪对Lys的需要量研究方面, King等^[2]利用氮平衡实验确定了对于哺育9头仔猪的母猪, 不动用体贮, 其对Lys的需要量为48 g/d。Coma等^[3]利用测定血浆尿素氮(PUN)作为一个快速指标, 测定Lys的需要量, 结果表明带仔数为10头、平均日窝增重为2.22 kg的哺乳母猪, 日采食总Lys为55.3 g时PUN最小, 暗示体蛋白质损失最少。Dourmad等^[4]运用氮平衡试验回归分析表明, 泌乳期初产母猪对日粮Lys的利用能力可达45~55 g/d, 从而最大限度地减少体蛋白的损失; 当可消化Lys水平低于45 g/d时, 母猪就动用大量的体蛋白质以维持产奶。张金枝^[5]以产活仔12头以上的经产母猪为对象, 研究蛋白质水平分别为11.5%、13.8%、15.9%、18.0%和20.2%, 其相应的

Lys 为 0.61%、0.74%、0.87%、1.0% 和 1.12% 的 5 种等能饲料, 对母猪繁育、泌乳及血浆尿素氮和游离氨基酸含量的影响。结果表明: 随着蛋白质和 Lys 摄入量的提高, 母猪泌乳期失重减少 ($P < 0.05$), 泌乳量则显著提高 ($P < 0.05$)。仔猪 20 d 和 35 d 的窝重均显著受母猪饲料营养水平的影响 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。血浆尿素 N 随蛋白质和 Lys 水平的提高而提高 ($P < 0.05$), 但血浆游离氨基酸总含量无显著差异。无论是母猪繁育效果还是泌乳性, 均以猪日摄入蛋白质 868 g、Lys 48.3 g 时, 获得了最佳效果。

泌乳母猪 Lys 还需考虑下一个周期的繁殖性能。Johnston 等^[6]报道, 4 d 断奶, 窝增重在 2.01~2.18 kg, 窝断奶仔猪 9.8 头的高产泌乳母猪, Lys 的需要量为 55 g/d 才能满足最大窝增重, 也不影响下一个周期繁殖成绩。Touchette 等^[7]认为, 为了增加下一产次的窝产仔数, 母猪在泌乳期间至少应摄入 45~48 g/d 的可消化 Lys, 这主要是因为摄入高于提高产奶量所需水平的 Lys 可减少体贮损失, 从而提高以后产次的窝产仔数。Tritton 等^[8]证实, 在第一个哺乳期内, 高 Lys 摄入 (58 g/d 以上) 可使第二胎产仔数由 9.6 头 (摄入量为 37 g/d) 增至 10.7 头。高水平的 Lys 摄入主要是使母猪哺乳期间体蛋白质损失最小, 从而有益于哺乳母猪后续繁殖性能的发挥。但 Santos 等^[9]对 120 头哺乳母猪的研究发现, 与饲料中 Lys 为 0.75% 的饲料相比, 高 Lys 饲料 (0.9%、1.05% 和 1.2%) 没有提高窝增重和缩短发情间隔以及减少体重损失。作者认为饲料 Lys 高于 0.75% 并无确切证据。

Yang 等^[10]用 36 头初产泌乳母猪研究 Lys 摄入, 对断奶后卵泡发育和卵母细胞成熟的影响, 结果发现, 在排卵前最大的 15 个卵泡内, 低剂量 Lys 组 (0.4%) 大卵泡率 (≥ 7.0 mm) 最低; 中卵泡率 (5.5~7.0 mm) 最高; 小卵泡率 (< 7.0 mm) 相当。低剂量 Lys 组的卵母细胞成熟率极显著低于中、高剂量组。这表明低 Lys 水平会损伤初产泌乳母猪卵泡发育, 降低卵母细胞成熟能力, 但高剂量与中等剂量 Lys 组并无进一步的正效应。Mejia-Guadarrama 等^[11]也有类似发现, 相对于高 Lys (1.02%) 日粮, 限制 Lys 的摄入将显著影响血浆 AA、GH、

IGF-I 和胰岛素, 对卵泡发育有负作用。Yang 等^[12]研究还发现, 获得最大窝增重的 Lys 日需要量在一胎、二胎和二胎分别为 44.55 和 56 g/d 时, 不影响母猪的体重变化、发情间隔和分娩率。

NRC (1998)^[13]推荐哺乳母猪总 Lys 需要量为 0.82%~1.03%。体重、年龄和胎次对母猪营养的影响让 Lys 需要量的研究变得更为复杂。Kim 等^[14]研究表明, 哺乳母猪在日采食 46.3g Lys 的基础上, 带仔数每增加 1 头, 每天额外需要增加 Lys 0.96 g, 以促进乳腺组织的发育。方桂友等^[15]选用 2~3 胎母猪 90 头进行对比饲养试验, 结果表明: 当日粮含 DE 约 3 320 kcal/kg, CP 为 16%, Lys 为 0.8%~1.0%, 母猪日采食量为 4.5 kg 时, 泌乳力好, 哺乳仔猪增重最快, 21 日龄头均重达 6.05~6.12 kg。赵世明等^[16]将 30 头大长北经产母猪随机分为 3 组, 产后饲喂 0.60% (I 组)、0.80% (II 组)、1.00% (III 组) 3 种 Lys 水平的泌乳期饲料, 结果发现, 在生产条件下, 大长北母猪泌乳期饲料 Lys 水平以 0.80%~1.00% 为宜^[15]。高天增等^[17]研究发现, 日粮 Lys 与粗蛋白质比例对哺乳母猪断奶至发情的间隔没有显著影响 ($P > 0.05$)。粗蛋白质为 17.0% 时, 长×大二元哺乳母猪最佳的 Lys 和粗蛋白质比例为 6.3 g/100g。张文娟等^[18]在夏季高温环境下 (平均温度为 29.5 °C), 在 120 头长白×约克杂交哺乳母猪的饲料中添加 5 种合成氨基酸, 发现蛋白质水平为 18.5 % 时哺乳母猪生产性能最佳, 此时饲料总 Lys 含量已达 1.2%。

2 实际饲料中泌乳母猪 Lys 需要量的确定

哺乳母猪 Lys 需要量确定有两种方法: 综合法和析因法。

2.1 综合法 以血清尿素氮、体蛋白损失、泌乳量、仔猪窝增重及断奶窝重等为指标, 根据带仔数、胎次的不同来确定饲料 Lys 的最适浓度。

尽管满足最佳繁殖性能的泌乳母猪 Lys 日需要量的估测差异很大, 但仔猪日增重与母猪 Lys 需要量仍然十分密切。Pettigrew^[19]根据已发表的数据和猪乳成分等对 Lys 的摄入量与窝增重进行了回归统计, 结果表明, 维持需要量为 49g Lys, 而每千克窝增重需要量为 26g Lys。

Lys 需要量 (g/d) = $-6.71 + 0.026 \times$ 窝增重

(g/d) ($r^2=0.77$)

该方程表示为每获得 1 kg 窝增重, 母猪要食入 26g Lys, 内源性体内动员 Lys 为 7 g/d, 因此泌乳母猪要达到 2 kg/d 的窝增重, 需要 52 g/d Lys, 减去内源动员的 7 g, 约为 45 g/d。

该方程与 NRC (1998) 模型类似, NRC^[13] 方程如下:

表观回肠可消化 Lys 需要量 (g/d) = $-6.390 + 0.022 \times$ 窝增重

2.2 析因法 将泌乳母猪每天总 Lys 需要量分为饲料 Lys 提供量和母体体蛋白动员所提供的 Lys 量, 两者之和就等于泌乳母猪维持需要与产奶需要之和。于是在给定营养、环境和遗传条件下, 可以建立泌乳母猪的需要量和反应模型。NRC (1998) 也指出, 尽管目前尚无令人信服的数据资料, 但认为模型计算出的这些营养水平能对高产泌乳母猪获得最佳的繁殖性能提供保障。

2.2.1 维持赖氨酸营养需要 有关母猪氨基酸的维持需要资料很少。根据生长猪可以相当准确地估算出母猪单位代谢体重的需要量, 目前多采用 Fuller (1989) 的推荐公式 (公式中的 0.90 为赖氨酸利用率)。

每日维持回肠可消化 Lys 需要量 = $0.036 \times$ 代谢体重 ($BW^{0.75}$)

每日维持总 Lys 需要量 (g) = $0.036 \times$ 代谢体重 ($BW^{0.75}$) $\div 0.90$

2.2.2 泌乳赖氨酸营养需要 泌乳的氨基酸需要量与乳的组成紧密相关。尽管泌乳期间乳的组成有一些变化, 但“分娩后 6~25 d 中, 母乳中蛋白质含量为 5.6%, Lys 含量为粗蛋白的 7.6%”这一数据却相对恒定, 尽管不同研究者的数据略有不同, 但都比较接近^[2]。泌乳期间, 原料的质量和日粮营养平衡可影响养分的利用率。Speer^[20] 研究认为蛋白质利用率泌乳期间为 80%, Lys 消化率为 90%, 因此其综合利用率为 72%。一般产奶量按照窝增重的 4 倍进行间接估算。Clowes 等^[21] 研究认为, 在 10 头乳猪平均日增重为 250 g 的条件下, 获得 1 g 增重需要 3.88 g 奶。

每日泌乳回肠可消化 Lys 需要量 = 窝仔猪生长速度 (g/d) $\times 4 \times 0.056 \times 0.076 \div 0.80$

每日泌乳总 Lys 需要量 = 窝仔猪生长速度

(g/d) $\times 4 \times 0.056 \times 0.076 \div (0.80 \times 0.90)$

2.2.3 体损失赖氨酸营养需要 NRC (1998) 考虑体损失是用回归方法得出一个固定的值, 即用 6.39 g/d 作为恒定的估算。Close (2000)^[22] 推荐了一种简单的估算方法。估算假定: 体损失的蛋白质含量为 17.5%, 该蛋白含 7.0% 的总 Lys 或 6.31% 的回肠可消化 Lys, 体蛋白质在动员过程中效率为 85%^[23]。

每日体损失回肠可消化 Lys 需要量 = 总体重损失 (g) / 泌乳周期 $\times 0.175 \times 0.85 \times 0.0631$

每日体损失总 Lys 需要量 = 总体重损失 (g) / 泌乳周期 $\times 0.175 \times 0.85 \times 0.07$ 。

以上为 Close 等^[22] 推荐的方法计算出泌乳母猪 Lys 的营养需要, 即饲料提供的 Lys = 维持 + 泌乳 - 体损失。NRC (1998) 模型提供 Lys 需要量计算公式除泌乳需要采用回归公式外, 维持和体损失的模型均相同。下表为两种方法估测泌乳母猪表观回肠可消化 Lys 需要量的比较。

表 1 两种方法估测泌乳母猪表观回肠可消化 Lys 需要量比较

| 项 目 | Close 等(2000) | | | NRC(1998) | | |
|-------------------|---------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | | | | | |
| 母猪初体重(kg) | 200 | 200 | 220 | 200 | 200 | 220 |
| 母猪末体重(kg) | 188 | 195 | 205 | 188 | 195 | 205 |
| 仔猪初生重(kg) | 1.4 | 1.4 | 1.6 | 1.4 | 1.4 | 1.6 |
| 仔猪断奶重(kg) | 6.1 | 6.2 | 6.5 | 6.1 | 6.2 | 6.5 |
| 窝产仔数(头) | 11 | 10 | 10 | 11 | 10 | 10 |
| 断奶天数(天) | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| 维持需要(g) | 1.91 | 1.91 | 2.06 | 1.91 | 1.91 | 2.06 |
| 泌乳需要(g) | 52.39 | 48.64 | 49.65 | 47.77 | 43.90 | 44.94 |
| 体损失提供(g) | 5.36 | 2.23 | 6.69 | 5.36 | 2.23 | 6.69 |
| 饲料提供(g) | 48.95 | 48.32 | 45.02 | 44.33 | 43.58 | 40.31 |
| 采食量(kg) | 5.35 | 4.80 | 5.50 | 5.35 | 4.80 | 5.50 |
| 饲料表观回肠可消化 Lys (%) | 0.91 | 1.01 | 0.82 | 0.83 | 0.91 | 0.73 |

其中, 所推荐的计算的可消化 Lys 值更接近最近出版的《美国猪营养指南》^[24] (2010) 版中 Lys 推荐量, 如在头胎母猪失重在 12 kg, 仔猪日增重 220 g, 窝产仔数 11 头等条件下, 《美国猪营养指南》(2010) 可消化 Lys 推荐为 1%, 而 Close 等 (2000)^[22] 为 0.91%, NRC (1998) 推荐为 0.83%。因此

实际中采用 Close 等的计算模型可能更符合现代高产母猪的实际。

3 小结

根据带仔数、胎次的不同,现代高产哺乳母猪的 Lys 需要量, 饲料 Lys 的最适浓度为 0.80%~1.28%, 日需要量为 45~56 g/d。实际情况中采用 Close 等 (2000)^[22] 的析因模型计算 Lys 的需要量可能更符合现代高产母猪的饲养实际, 从而最大限度地提高哺乳性能和繁殖性能。

参考文献:

- [1] Cameron N D, Kerr J C, Garth G B, et al. Genetic and nutritional effects on lactational performance of gilts selected for components of efficient lean growth[J]. *Animal Science*, 2002, 74:25-38.
- [2] King R H, Toner M S, Dove H, et al. The response of first-litter sows to dietary protein level during lactation[J]. *J Anim Sci*, 1993, 71:2457-2463.
- [3] Coma J, Zimmerman D R, Carrion D. Lysine requirement of the lactating sow determined by using plasma urea nitrogen as a rapid response criterion[J]. *J Anim Sci*, 1996, 74:1056-1062.
- [4] Dourmad J Y, Noblet J, étienne M. Effect of protein and lysine supply on performance, nitrogen balance, and body composition changes of sows during lactation[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76:542-550.
- [5] 张金枝, 邵庆均, 卢伟, 等. 高产泌乳母猪饲料蛋白质与赖氨酸参数的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2001, (5):7-9.
- [6] Johnston L J, Pettigrew J E, Rust J W. Response of maternal-line sows to dietary protein concentration during lactation[J]. *J Anim Sci*, 1993, 71:2151-2156.
- [7] Touchette K J, Allee G L, Newcomb M D, et al. The lysine requirement of lactating primiparous sows[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76:1091-1097.
- [8] Tritton S M, King R H, Campbell R G, et al. The effects of dietary protein and energy levels of diets offered during lactation on the lactational and subsequent reproductive performance of first-litter sows[J]. *J Anim Sci*, 1996, 62:573-579.
- [9] Santos J M G, Moreira I, Martins E N, et al. Lysine and metabolizable energy requirements of lactating sows for subsequent reproductive performance[J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2006, 49:575-581.
- [10] Yang H, Foxcroft G R, Pettigrew J E, et al. Impact of dietary lysine intake during lactation on follicular development and oocyte maturation after weaning in primiparous sows[J]. *J Anim Sci*, 2000, 78:993-1000.
- [11] Mejia-guadarrama C A, Pasquier A, Dourmad J Y, et al. Protein (lysine) restriction in primiparous lactating sows: effects on metabolic state, somatotrophic axis, and reproductive performance after weaning[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80:3286-3300.
- [12] Yang H, Pettigrew J E, Johnston L J, et al. Lactational and subsequent reproductive responses of lactating sows to dietary lysine (protein) concentration[J]. *J Anim Sci*, 2000, 78:348-357.
- [13] NRC. Nutrient requirements of swine[M]. 10th ed natl acad press, Washington DC. 1998.
- [14] Kim S W, Osaka I, Hurley W L, et al. Mammary gland growth as influenced by litter size in lactating sows: impact on lysine requirement[J]. *J Anim Sci*, 1999, 77:3316-3321.
- [15] 方桂友, 董志岩, 冯玉兰. 日粮不同蛋白质、赖氨酸水平对泌乳母猪生产性能的影响[J]. *福建畜牧兽医*, 2000, (2):1-2.
- [16] 赵世明, 高振川, 姜云侠, 等. 泌乳母猪饲料适宜赖氨酸水平的初步研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(3):206-212.
- [17] 高天增, 王凤来, 李德发, 等. 日粮赖氨酸与粗蛋白质比例对哺乳母猪繁殖性能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(4):7-9.
- [18] 张文娟, 吴德, 方正峰, 等. 饲料不同蛋白质水平下添加合成氨基酸对夏季哺乳母猪生产性能及氮排泄的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(2):285-292.
- [19] Pettigrew J E. Amino acid nutrition of gestating and lactating sows[J]. *Biokyowa Technical Reviews*-5, 1993.
- [20] Speer V C. Partitioning nitrogen and amino acids for pregnancy and lactation in swine: a review[J]. *J Anim Sci*, 1990, 68:553-561.
- [21] Clowes E J, Wiuiams H, Baracos V E, et al. Feeding lactating primiparous sows to establish three divergent metabolic states: il effect on nitrogen partitioning and skeletal muscle composition[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76:1154-1164.
- [22] Close W H, Cole D J A. Nutrition of sows and boars [M]. trumpton: nottingham university, 2000. 373.
- [23] Whittemore C T, Morgan C A. Model components for the determination of energy and protein requirements for breeding sows: a review[J]. *Livest. Prod. Sci*, 1990, 26:1-37.
- [24] Whitney Mark H. Lactating swine nutrient recommendations and feeding management, National Swine Nutrition Guide[M]. 2010. US Pork Center of Excellence; <http://www.usporkcenter.org/home/projects/national-swine-nutrition-guide.aspx>.

猪链球菌检测及分型方法研究进展

洪伟彬¹, 黄育浩¹, 姜艳华²

(1. 东莞市动物疫病预防控制中心, 广东 东莞 523086; 2. 新雅农业发展有限公司, 山东 青岛 266000)

摘要:猪链球菌是一种重要的人畜共患病病原, 有多个血清型, 不同血清型的毒力也不相同, 因此, 对猪链球菌的鉴定和分型就显得尤为重要。目前, 有许多方法应用于猪链球菌的检测及分型, 包括常规的病原学诊断、血清学方法、生化实验以及应用最为广泛的分子生物学技术。本文就这几种方法展开详细的论述。

关键词:猪链球菌; 检测方法; 分型

中图分类号: S855.1*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0009-04

猪链球菌(*Streptococcus suis*)是一种分布十分广泛的人畜共患病病原,按荚膜多糖的差异,猪链球菌可以分为35个不同的血清型(1~34型和1/2型)。该病不仅给养猪业带来严重的经济损失,还给人类公共卫生事业造成了十分严重的威胁。1968年丹麦首次报道人感染猪链球菌,随后北欧、南亚等养猪以及食用猪肉的国家和地区也相继出现人感染猪链球菌的报道,目前已报道超过700例,主要分布在亚洲地区^[1]。1998年,江苏省爆发猪链球菌2型疫情,引起25人发病,14人死亡;2005年6月,四川部分地区再次暴发严重的猪链球菌疫情,报道病例204例,死亡38例。此次疫情爆发之后,猪链球菌引起我国政府和学者的高度关注,开始投入大量的人力、财力进行猪链球菌病的诊断及防治工作。本文就链球菌的检测方法以及分型技术做一综述,为该病的诊断及防治提供参考。

1 细菌形态特征

链球菌在显微镜下呈圆形或卵圆形,直径小于0.2 μm,常成双排列或成链状。革兰氏染色阳性,除D群个别细菌外,均无鞭毛,多数有荚膜。血琼脂平板上可长成直径0.1~1.0 mm,灰白色、表面光滑、边缘整齐的小菌落,多数致病菌株具有溶血能力,溶血环的大小和类型因菌株而异。一般分为α、β和γ三个溶血类型:α型溶血链球菌,在菌落周围形成1~2 mm宽不透明的草绿色溶血环,也称甲型溶血。β型溶血性链球菌,菌落周围形成一个2~4 mm宽、界限分明、完全透明的无色

溶血环,也称乙型溶血。γ型溶血链球菌,不产生溶血素,菌落周围无溶血环,称为丙型或不溶血性链球菌。

2 生化试验

链球菌均能发酵葡萄糖、蔗糖,但对乳糖、菊糖、海藻糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、棉籽糖、蕈糖等的利用能力则因不同菌种而不同。Gottschalk等建议将VP阴性、6.5%NaCl生长阴性、水杨苷阳性、海藻糖阳性等作为猪链球菌的特征性生化反应。然而,由于生化试验结果变化较大,作者建议只将生化试验作为血清学试验的补充试验。

3 血清学试验

血清学试验以抗原与抗体的特异性反应为基础,一般在体外一定条件下进行。链球菌血清学检测常用的方法有ELISA以及协同凝集试验等。

3.1 间接凝集反应 Gottschalk等^[2]将制备的型特异性抗血清制成多价协同凝集用血清,然后用该混合的抗血清进行协同凝集试验,从而鉴定猪链球菌的血清型。结果表明,多价协同凝集(PR)用抗血清能很好地对猪链球菌进行定型,尤其是在鉴定大量分离株的情况下,该混合抗血清显得尤为可靠和实用。

3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA) Vecht^[3]等利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(DAS)对猪链球菌2型致病菌株与非致病菌株进行研究,试验结果表明建立的两个DAS-ELISAs在诊断猪链球菌2型致病菌株方面具有快速、可靠、简单等优点,mrp和ef的DAS检测结果与western blot的检

测结果几乎一致。Campo 等^[4]以荚膜多糖做抗原的 ELISA (CPS-ELISA) 方法检测猪链球菌 2 型的抗体, 并与菌体做抗原的 ELISA (WCA-ELISA) 方法进行比较。结果显示, 检测其它血清型的兔抗血清时, WCA-ELISA 的特异性很低, 由于存在共同抗原, 因此出现交叉反应, 而标准化的 CPS-ELISA 在每孔用 0.1 mg 的抗原时交叉反应能显著地减少, 但与 1/2、12 和 17 的交叉反应仍然存在。

王海丽等^[5]研制了抗 SS2 溶菌酶释放蛋白 (MRP) 单克隆抗体 (McAb), 并对其生物学活性进行了分析, 通过间接 ELISA 方法筛选获得了 6 株能稳定分泌抗 MRP McAb 的杂交瘤细胞。经检测, 单抗腹水的抗体效价为 $1:10^4 \sim 1:10^5$, 杂交瘤细胞培养上清液的效价为 $1:128 \sim 1:512$ 。Western-blotting 鉴定表明, 6 株单抗均具有特异的生物学活性, 从而以 2B8 单抗腹水和 SS2 多克隆抗血清建立的夹心 ELISA 方法可特异地检测 MRP。

4 分子生物学方法

随着新技术的不断出现和成熟, 研究已经从常规的病原学鉴定深入到分子方面。猪链球菌的诊断也先后采用了许多新的检测技术, 这些技术不仅可以检测出猪链球菌, 甚至可以区分猪链球菌的不同血清型。

4.1 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) Okwumabua 等^[6]用 PCR 方法检测实验室分离的 35 个不同血清型的猪链球菌, 结果显示该方法不仅可以同时鉴别 1 (14), 2 (1/2), 7 型和 9 型菌株, 而且具有很高的特异性, 与其余 9 种链球菌、18 种 G⁻ 菌和 9 种 G⁺ 菌之间不存在交叉反应, 可以作为一种快速、简便、可靠的猪链球菌检测和鉴别方法。科研工作者^[7, 8]建立了猪链球菌 2 型及其毒力因子多重 PCR 检测方法, 能同时检测猪链球菌 2 型的毒力因子 cps、mrp 以及 epf, 试验证明多重 PCR 有很强的特异性和高度的敏感性, 为该病的快速诊断及流行病学调查提供了新的技术手段。Silva^[9]等以 gdh 基因序列为基础建立的多重 PCR 能同时鉴别 1、2、7 型和 9 型菌株, 依据 epf、mrp、sly 等毒力相关基因建立的多重 PCR 至少能区分 6 种 mrp 变异株。

郑峰等^[10]建立了一种快速检测 2 型猪链球菌的多重荧光 PCR, 他们从 GenBank 中获得 2 型猪链球菌荚膜抗原编码基因簇中的 cps21 和溶菌素释

放蛋白基因 mrp, 设计引物和 Taqman 荧光探针, 进行荧光 PCR 检测。该多重荧光 PCR 除可以特异性地检测 2 型猪链球菌, 并不能检出猪链球菌、大肠杆菌等参考细菌和空白对照。灵敏度为 10 个细菌的最小检测量, 仅需 60 min。稳定性试验表明: 2 次检测所得的 Ct 值之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。

4.2 基因芯片技术 郑峰等^[10]针对猪链球菌 cps1 (检测 SS1 和 SS14)、cps2 (检测 SS2 和 SS1/2) 及 cps9 基因的保守区设计型特异性寡核苷酸探针, 以鉴别猪链球菌主要致病血清型; 同时选取包括 epf、fbp、gdh、m rp、sly 等毒力基因作为检测靶位点, 在特异性杂交后, 在扫描仪上分别使用 cy3 和 cy5 最佳激发光强度进行扫描。cy3 标记的 S735 基因组可与检测猪链球菌 16S rDNA、cps2、epf、fbp、gdh、m rp 和 sly 等基因的探针结合, 而 cy5 标记的 SS9 标准株基因组可与检测猪链球菌 16S rDNA cps9、fbp、gdh 等基因的探针反应, 检测结果与两株菌的已知基因背景一致。同样用 cy3 标记 98HAH12 (SS2) 基因组进行杂交, 可于 16S、epf、fbp、gdh、m rp 和 sly 处产生特异性杂交信号, 而以 cy5 标记的马链球菌兽疫亚种 (与 SS 亲缘关系最近的链球菌) 基因组作为阴性对照进行杂交, 则无任何信号点出现。

4.3 多位点酶电泳技术 (Multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE) Hampson 等^[11]用多位点酶电泳 (MLEE) 对澳大利亚 21 个血清型的猪链球菌进行分型。以不同血清型菌株都存在的 16 种基本酶分子为指标, 鉴定了 109 株分离菌, 得到 65 种不同的电泳型 (ETs)。在使用 MLEE 法研究健康猪与发病猪体内分离的猪链球菌 2 型, 发现 124 株分离株共存在 17 种不连续的 Ets, 其中 Ets1 和 Ets8 与发病猪的关系最为密切, 然而健康猪体内分离的猪链球菌的也存在这两个类型。如果要区分 ETs 究竟是来源于健康猪还是发病猪, 还需要进行进一步的研究^[12]。

4.4 利用 16SrRNA 对 SS 进行研究 Sonia^[13]测定了猪链球菌 35 个血清型的 16S rRNA 序列, 并对 16S rRNA 序列进行了相似性分析, 结果显示各菌株之间的相似程度在 93.94%~100% 之间。除去亲缘关系较远的 32、33、34 型, 另外的 32 个血清型可定为一个群。根据基因的差异, 该群 32 个血清型的 32 株细菌可进一步分成 3 个簇。这 32

个血清型 16S rRNA 的 48~91 bp 为高变区, 92~1468 bp 是高度保守区。虽然不同种链球菌 16S rRNA 的差异碱基集中在相对狭小的高变区, 但碱基的差异确实存在, 并且 16SrRNA 的碱基序列不随外界的条件变化而改变, 因此可以根据 16S rRNA 对猪链球菌进行基因分型。

4.5 核糖体分型技术 (Ribotyping) 由于 rRNA 在细菌的成长过程中具有高度的保守性, 因此通过限制性片段长度多态性分析编码 rRNA 的基因, 可以为细菌的分类、诊断以及流行病学调查提供帮助。在猪链球菌检测方面, 该方法也得到了广泛的应用。有学者在研究同一血清型及不同血清型菌株基因之间的差异时发现, 该方法能同时区分 2 型致病菌株与非致病菌株基因。结果表明: 核糖体分型技术既能成功地分辨出血清学和生化试验无法检测的菌株差异, 又可确定猪链球菌毒力^[14]。Smith 等^[15]通过毒力因子(mrp, ef)与相应的核糖体片段区分 1 型和 2 型致病性菌株。Smith 用此方法对 5 个血清型的 42 株 SS 进行分型, 结果显示这些菌株对猪的致病能力以及表达的毒力因子(mrp 和 ef)都不相同。

4.6 随机扩增 DNA 片段多态性分析(Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) Chatellier 等^[16]用 RAPD 研究 2 型分离株的基因型, 用三对引物对来源于不同国家的 88 株猪链球菌 2 型分离株(80 株猪源菌, 8 株人源菌)进行 RAPD 分析, 共得到 23 个 RAPD 型, 人体分离的细菌与猪体内分离的细菌具有相同的 RAPD 型。RAPD 分析后发现致病菌株都呈 sly+mrp+ef+ 基因表型, 基因型 sly-mrp-ef- 的菌株具有相同的 RAPD。数据表明, RAPD 是鉴定 sly+mrp+ef+ 基因型致病菌株的有效手段, 与其他分型方法相结合能分析人源猪链球菌和猪源猪链球菌之间的进化关系。

4.7 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) Florence Berthelot-Herault 等^[17]利用 PFGE 对血清型 2、1/2、3、7 和 9 的 123 株(分别来源于法国猪以及不同国家的人)猪链球菌进行基因多样性研究。基因的多样性研究中共得到了 74 个 PFGE 型, 将其分为三个群(A、B、C), 这三个群之间的相似性为 60%, 以 69% 的同源性为标准可进一步分 a~h 共 8 个亚型; 不同来源的猪链球菌基因多样性研究中(发病猪和人的 90

株猪链球菌)发现了 55 个 PFGE, 研究还发现猪源和人源分离的链球菌都分布在 B 群(P34、P45、P57、P59 和 P62), 从而证实了猪链球菌为人兽共患病原体, 很可能从猪传染给人。Korawan Wongsawan 等^[18]利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对泰国某地区的 72 株 SS2 分离株进行基因多样性研究, 发现可以将这 72 株 SS2 分离株分为 36 个 PFGE, 说明经常分离的猪链球菌 2 型存在明显的基因多样性。

4.8 分子伴侣(Cpn60)基因对 SS 进行基因分群 Ronald Brousseau 等^[19]为了建立一种猪链球菌不同血清型的快速鉴别方法, 他们将猪链球菌 35 个血清型编码 Cpn60 的基因进行扩增, Cpn60 部分基因分析结果显示, 35 个血清型中存在四组相同的核酸序列, 血清型 2、14、15, 血清型 17 与 19, 血清型 18 与 23 以及血清型 20、22、26 的 Cpn60 分别相同。35 个血清型 Cpn60 基因的分群结果与 16S rRNA 的分群结果相同, Cpn60 的系统进化树与 16S rRNA 的系统进化树相似, 并且 Cpn60 序列相同的菌株都具有相同的 16S rRNA 序列, 然而, 35 个血清型的 Cpn60 基因之间的距离比 16S rRNA 的距离远, 因此 Cpn60 的区分度更大。Cpn60 基因的系统进化树中也出现了群聚, 所以该方法也能从链球菌属中鉴别出猪链球菌, 并且还可以根据 Cpn60 的高变区进一步设计特异性引物, 为快速鉴定血清型提供可靠的帮助。

4.9 基因指纹技术 (Genomic Fingerprinting) Mogollon 等应用基因指纹技术对猪链球菌 23 个血清型(1-22 型, 1/2 型)的菌株进行研究。结果表明, 基因指纹技术不仅可以鉴别猪链球菌分离株基因的差异, 还可以用来研究猪链球菌的流行情况, 传播方式以及发病猪群的病源。该作者对两个猪场的脑膜炎猪链球菌分离株进行研究, 发现 66 株不同血清型的猪链球菌都表现为水平传播。有学者^[20]用基因指纹技术研究猪链球菌亚型在猪群中的垂直传播情况, 分析了三个猪场的 15 株猪链球菌 5 型后发现, 猪链球菌可以在母猪体内存活, 当分娩时经产道或哺乳时通过消化道传给下一代^[20]。

5 结语

猪链球菌是猪群中一种常见的条件致病菌, 细菌通常定居在猪的上呼吸道(特别是扁桃体和鼻腔)、生殖道或消化道, 严重时可引起肺炎、脑膜

炎、败血症以及关节炎。人感染后也可出现脑膜炎、败血症、关节炎、肺炎、心内膜炎、眼内炎以及腹膜炎等严重症状,甚至可以引起死亡。对于本病来说,血清学技术依然是一种最基本诊断方法,然而目前国内还没有诊断用的标准抗血清,国外虽有商品化的诊断血清,而应用成本却相当高。这就给我们的快速诊断带来了一定的困难。随着对链球菌分子生物学研究的不断深入,以 PCR 技术为代表的分子生物学技术在链球菌的诊断及分型中起到了越来越重要的作用。但是由于其本身的限制,例如需要专业的技术人员,昂贵的仪器等等,使得该技术在基层的推广遇到了一些困难。因此,在链球菌的诊断上,我们要坚持血清学方法和分子生物学方法相结合的原则,加快标准诊断方法等方面的研究,为猪链球菌病的快速诊断和防控奠定基础。

参考文献:

- [1] Wertheim H F, Nghia H D, Taylor W, et al. Streptococcus suis: an emerging human pathogen[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5):617-625.
- [2] Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of Streptococcus suis[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8):2192-2194.
- [3] Vecht U, Wisselink H J, Anakotta J, et al. Discrimination between virulent and nonvirulent Streptococcus suis type 2 strains by enzymelinked immunosorbent assay[J]. Vet Microbiol, 1993, 34:71-82.
- [4] Campo Sepulveda E M, Altman E, Kobisch M, et al. Detection of antibodies against Streptococcus suis capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA [J]. Vet Microbiol, 1996, 52(1-2):113-125.
- [5] 王海丽, 徐公义, 王长军, 等. 链球菌 2 型人源分离株 MRP 单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2008, (5):74-81.
- [6] Okwumabua O, Oconnor M, Shull E. Apolymerase chain reaction (PCR) assay specific for Streptococcus suis based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 218(1):79-84.
- [7] Wei Z, Li R, Zhang A, et al. Characterization of Streptococcus suis isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. Vet Microbiol, 2009, 137(1-2):196-201.
- [8] 陈博文, 罗宝正, 陈竞帆, 等. 多重荧光 PCR 检测 II 型猪链球菌方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2007, 27(3):75-89.
- [9] Silva L M, Baums C G, Rehm T, et al. Virulence-associated gene profiling of Streptococcus suis isolates by PCR[J]. Vet Microbiol, Available Online 20 January 2006.
- [10] 郑峰, 王长军, 曾海攀, 等. 猪链球菌基因芯片检测方法的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(1):38-41.
- [11] Hampson D J, Trott D J, Clarke I L, et al. Population structure of Australian isolates of Streptococcus suis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31:2895-2900.
- [12] Bahloul H, Mofredj A, Mrabet A, et al. Méningite à Streptococcus suis secondaire à une contamination orale?[J]. Médecine et Maladies Infectieuses, 2008, 38(5):281-282.
- [13] Sonia Chatellier, Jose Harel, Ying Zhang, et al. Phylogenetic diversity of streptococcus suis strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48:581-589.
- [14] Ghyslaine Vanier, Nahuel Fittipaldi, Josh D. Slater, et al. New putative virulence factors of Streptococcus suis involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells[J]. Microbial Pathogenesis, 2009, 46(1):13-20.
- [15] Smith H E, Rijnburger M, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Virulent strains of Streptococcus suis serotype 2 and highly virulent strains of Streptococcus suis serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35:1049-1053.
- [16] Chatellier S, Gottschalk M, Higgins R, et al. Relatedness of Streptococcus suis serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping[J]. Clin Microbiol, 1999, 37:62-66.
- [17] Florence Berthelot-Herault, Corinne Marois, Marcelo Gottschalk, et al. Diversity of Streptococcus suis Strains Isolated from Pigs and Humans as Revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis[J]. Clin Microbiol, 2002, 40(2):615-619.
- [18] Korawan Wongsawan, Naoki Takenami, Sumalee Pruksakorn, et al. Genetic diversity of Streptococcus suis isolated from pigs and humans in Chiang Mai and Lamphun province[C]. Thailand. International Congress Series, 2006, 1289:151-154.
- [19] Broussesu R, Hill J E, Prefontaine G, et al. Streptococcus suis serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences [J]. Env Microbiol, 2001, 67:4828-4833.
- [20] Nahuel Fittipaldi, Troy E, Fuller Janet, et al. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of Streptococcus suis isolated in the United States[J]. Vet Microbiology, 2009, 139(3-4):310-317.

副猪嗜血杆菌的分型技术研究进展

余小利, 苏丹萍, 贺东生*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 是猪的一种条件致病性病原菌。近年来世界各地副猪嗜血杆菌病的发生呈显著上升趋势, 猪只感染后表现为多发性浆膜炎和关节炎, 给养猪业造成巨大的经济损失。随着分子生物学技术的发展, 用于副猪嗜血杆菌分型鉴定的方法亦越来越多。本文就目前国内外常用的技术方法作一综述, 以期为该病的流行病学调查、兽医临床诊断与治疗提供参考。

关键词: 副猪嗜血杆菌; RFLP; ERIC; MLST; RAPD

中图分类号: S855.1*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0013-04

Research progress on typing of *Haemophilus Parasuis*

Yu Xiaoli, Su Danping, He Dongsheng*

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

Abstract: *Haemophilus parasuis* (Hps) is a conditional pathogenic bacteria of pigs, which is the pathogen of Glasser's disease. In recent years, a respiratory infectious disease characterized by polyserositis and arthritis increased largely and resulted in enormous economic losses in pig industry. Along with the development of molecular biology, the typing and identification methods increase largely. The common typing methods of *Haemophilus parasuis* were reviewed in this article, which would provide reference for the epidemiological investigation, clinical diagnosis and treatment of *Haemophilus parasuis*.

Key words: *Haemophilus parasuis*; restriction fragment length polymorphism; enterobacterial repetitive intergenic consensus; multilocus sequence typing; random amplified polymorphic DNA

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 是猪的一种条件致病性病原菌, 也是 Glasser's 病^[1]的病原, 其血清型较多, 已确定有 15 个血清型^[2]和约 20% 的未分型的分离株^[3]。Hps 与其它病原性细菌混合感染现象非常普遍^[4,5], 现有的血清学分型通常不能鉴别来源不同的所有副猪嗜血杆菌分离株^[6]。而依赖分子生物学的方法准确性、敏感性、特异性、分型率和分辨力均极高, 克服了血清学分型的局限性。目前国内外用于 Hps 分型的方法众多, 本文就四种主要分型技术作一综述, 以期为该病的分子流行病学研究、兽医临床诊断与治疗提供参考。

1 限制性片段长度多态性分析方法

限制性片段长度多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 方法是以特定基因为研究对象, 具有操作简便, 不进行分离纯化即可直接检测临床样本等优点, 被广泛应用

于多种细菌的基因分型。该方法常用于副猪嗜血杆菌的基因分型, 主要针对副猪嗜血杆菌转铁蛋白 A (transferrin-binding proteins A, *tbpA*) 编码基因和 *aroA* 基因进行了大量的研究。

副猪嗜血杆菌转铁蛋白 A (*tbpA*) 作为 RFLP 的鉴定和分析的首选基因, 能区分猪嗜血杆菌的 15 个血清型和一些未分型的血清型, 还被用于细菌的分类^[7]。Redondo 等^[8]根据 H411 分离株 (Genbank 注册号为 AF-336803) 的 *tbpA* 基因序列设计合成 1 对特异引物 (*tbpA*-5:5' -TTAGCCTTGCTCTCTTA-GCC-3'; *tbpA*-3:5' -AAGCTTGAACTAAGGTACTC-TAA-3'), 扩增片段大小为 1 905 bp。并运用 PCR-RFLP 分型技术扩增 15 株副猪嗜血杆菌标准株的 *tbpA* 基因, 再分别用限制性内切酶 *TaqI*、*AvaI* 和 *RsaI* 处理。结果形成 12 种不同的 RFLP 图谱, 其中血清型 5、12、14 和 15 形成相同的限制性内切酶图谱 (DBE)。李军星等^[9]采用 PCR-RFLP 方法

收稿日期: 2010-04-29

*: 通讯作者

对6个省市的57个Hps分离株及15个参考菌株进行PCR-RFLP分析,分别得到13种和9种RFLP图谱。得到的15个RFLP模式中,只有3个RFLP模式与参考菌株的相同,说明同一RFLP模式的菌株不一定属于同一血清型,且流行菌株的RFLP模式也有地域差异。李郁等^[10]应用PCR-RFLP对安徽12株HPS分离菌进行基因分型,通过Taq I、Ava I、Rsa I酶切12株Hps的tbpA扩增片段,得到5种不同的RFLP基因图谱,并利用豚鼠进行致病性试验,分析了12株HPS的tbpA基因序列系统进化关系。发现Hps的RFLP基因型不同,其致病性也存在差异。表明Hps的RFLP基因型与其致病性相关。蒋征等^[11]也对6个分离株进行了RFLP研究,结果表明6个分离株属于4种不同的Hps基因型。由此可见,我国Hps流行株存在多种基因型,采用PCR-RFLP分析副猪嗜血杆菌流行病学规律具有实用意义。

细菌aroA基因编码产物是细菌芳香族氨基酸代谢通路中一个非常重要的酶,已被用于细菌的分类。aroA基因用于HPS分型的上游引物为:5'-GCCGCTTAGCGAAAGGGACGAC-3';下游引物为:5'-GTAGGTTGCAATTTCTGCGTGT-3'。国外学者Rio^[12]首次报道了Hps的15个血清型存在aroA基因,并利用PCR和RFLP技术将Hps的15个血清型参考菌株aroA基因片段进行RsaI和Sau3AI限制酶谱分析,结果显示血清3型和7型与其它血清型明显不同。国内学者薛晓晶等^[13]首次对Hps的15个血清型国际参考菌株及地方分离株aroA全基因序列进行了鉴定,并与其它革兰氏阴性细菌进行比对和遗传进化分析。结果显示Hps不同血清型菌株均可扩增出包含完整aroA基因的1476 bp片段,且不同血清型菌株间核苷酸序列相似性在97.7%以上。与其它革兰氏阴性细菌也有较高的相似性,这为研究aroA基因在Hps中的生物学活性奠定了基础。

RFLP已被广泛应用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物分类等的研究。但该方法需要内切酶识别位点上的变异才能检出,而且操作复杂耗时,所需DNA量大,一些血清型利用RFLP-PCR难以进行区分,限制了其在流行病学上的应用。

2 肠道细菌基因间重复序列

肠道细菌基因间重复序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus,ERIC)是Sh-

arples等^[14]首先在大肠杆菌中发现的一种基因间重复序列,也称为“基因间重复单位”(Intergenic Repetitive Unit,IRU)^[15]。该序列长约124~127 bp,位于基因的非编码区,呈高度保守的中心反向重复序列。ERIC-PCR的原理类似于反向PCR,是利用ERIC核心高度保守序列设计引物进行PCR,扩增出细菌基因组结构特征的条带以达到菌株分型的目的。1991年Versalovic等^[16]设计引物(ERIC1:5'-ATGTAA GCTCCTGGGGA-TTCAC-3';ERIC2:5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-G-3')并建立了ERIC-PCR技术,在对革兰阴性菌的鉴定方面取得很好的效果。

ERIC技术具有操作简便、快速,重复性高、分辨力强,对DNA纯度要求不高,只需一套专业化设备,一台热循环仪即可完成。ERIC在基因组中的分布和拷贝数具有种属特异性等优点。2000年以来ERIC-PCR逐渐用于革兰阴性及阳性菌的鉴定、流行病学调查、单个菌株的基因组多态性分析等方面的研究^[17,18]。近年来该技术逐渐用于Hps的研究。针对副猪嗜血杆菌基因间重复一致序列特异引物ERIC-PCR法,对退火温度加以严格控制,用15种血清型作为参考系,建立ERIC-PCR指纹图谱,并根据迁移带的大小和多少(对应重复序列间的距离和拷贝数)可作为15种副猪嗜血杆菌分子分型的标准。超出该范围的血清型,就是新的血清型,从而解决了20%的未分型分离株的问题,使所有的分离株都可分型。Rafiee等^[19]将该技术用于Hps菌的分型,发现其具有很高的分辨率及快捷、方便的优点。朱必凤等^[20]对分离到的6株副猪嗜血杆菌的基因组DNA进行了ERIC-PCR研究。初步确定1号分离株为血清型11;2、3和4号分离株为血清型13;5号分离株为血清型12;6号分离株为血清型10。用ERIC方法可有效地进行血清型的分辨。

该法对探究Hps的感染源和传播途径等流行病学问题具有良好的应用前景,但也存在一些局限性。如模板量相对较大,DNA易降解而不能有效分型,所得图谱不稳定,高度变异性难于共享各实验室间的分型信息等问题还有待解决。尽管如此,ERIC-PCR仍是一种较方便的检测方法。

3 多位点测序分型

多位点测序分型(Multilocus sequence typing,MLST)是Maiden等^[21]为研究菌群基因结构

而设计的一种高分辨率分型技术。作为一种直接在基因水平上对微生物进行分型的方法,该法既适用于分子流行病学研究,也适用于分子进化学研究,并已成功应用于多种人类病原体的研究,包括猪链球菌^[22]和全球金黄色葡萄球菌^[23]的研究。

目前,MLST法是用于Hps的基因分型研究的一种新方法。该法通过对细菌基因组中长度约为470 bp的7个看家基因mdh、6pgd、atpD、g3pd、frdB、infB和rpoB的核苷序列的分析,合成7对引物对这7个基因进行扩增、测序,然后与Internet上EMBL/GenBank数据库中已有序列比较,指定每个基因的等位基因编号,不同的菌株对应不同的序列型(sequence-typing,ST)^[21],从而揭示细菌菌株之间的多态性。国外学者Olvera等^[8]对11个Hps标准菌株和120个Hps临床分离株进行MLST分析,结果显示了109种序列类型。经系统树分析,得到1、2两个分枝,其中分枝2的菌株高度相似,大多数为与临床病理损害相关的假定有毒菌株,提示这可能是一个毒力增强的谱系;分枝1则大多数为鼻腔分离株,只有少数为可能的潜在有毒菌株。

MLST分型法与其他分型方法相比,具有分辨率高、重复性好、序列数据明确可靠、不同实验室间易进行比较等优点^[24]。此外,MLST检测材料易于获取,对DNA要求不高,易于对微生物种群进行鉴定。通过分析MLST数据探究菌株的起源和进化,有利于长期大范围的流行病学调查。但MLST应用起来也存在一定的限制,如工作量大,技术要求严格,需特殊仪器设备,费用高,不适合暴流行的常规调查和全球流行病学水平的监督。MLST作为实验室鉴定还是比较优先的选择,从而为Hps的流行病学研究提供了巨大的信息资源。

4 随机扩增多态性聚合酶链反应(RAPD-PCR)

随机扩增多态性聚合酶链反应(Random Amplified Polymorphic DNA,RAPD-PCR)又称任意引物PCR。近年来广泛应用于生物物种全基因组DNA的多态性检测分析,在动物方面的研究有很大的发展空间。朱必凤等^[20]采用RAPD分析并证明Hps分离株可分为四种类型的菌株,与特异性引物PCR结果一致。由于RAPD-PCR分析的DNA多态性,其特异带可能会与不同地域的分离株有差异,因此只能作为参考,而不能作为血清型分型的

主要依据。

RAPD分型法具有快速简便、易操作、成本较低、DNA需要量少、且无需预先了解目的基因和相应序列等特点^[25]。但也存在一些局限性,如:不同实验室间分型结果不具备可比性,需较低的退火温度,易受模板质量、PCR反应试剂和条件的影响,重复性不太高,存在共迁移问题等。因而,应用该法必须注意对实验条件的严格控制,在进行同一项研究工作时需要注意PCR试剂和反应体系等因素。

综上所述,副猪嗜血杆菌感染的各种基因分型方法都有一定的局限性。总的来说各方法都能达到分型的目的。针对tbpA基因和aroA基因的PCR-RFLP分析法对副猪嗜血杆菌流行病学规律具有实用意义。MLST是一种新的分型方法,具有可重复性、高辨别力,易于共享的优点,可作为实验室鉴定比较优先的选择。随着分子生物学的发展,对副猪嗜血杆菌分离株的研究将成为流行病学研究的重点。

参考文献:

- [1] Oliveira S,PiJoan C.Haemophilus parasuis:new trends on diagnosis,epidemiology and control[J].Vet Microbiol, 2004,99(1):1-12.
- [2] Kielstein P,Rapp-Gabrielson V.Designation of 15 serovars of Haemophilus parasuis on the basis of immunodiffusion using heatstable antigen extracts[J].J Clin Microbiol,1992,30(4):862-865.
- [3] Oliveira S,Blackall P J,PiJoan C.Characterization of the diversity of Haemophilus parasuis field isolates by use of serotyping and genotyping[J].Am J Vet Res, 2003,64(4):435-442.
- [4] Cai X,Chen H,Blackall PJ, et al.Serological characterization of Haemophilus parasuis isolates from China[J].Vet Microbiol,2005,111(3-4):231-236.
- [5] 陈健雄.副猪嗜血杆菌和多种病原混合感染的案例分析[J].国外畜牧学(猪与禽),2009,29(3):86-88.
- [6] Del Rio M L,Gutierrez C B,Rodriguez Ferri E F.Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping Haemophilus parasuis[J].J Clin Microbiol,2003,41(2):880-882.
- [7] Cascon S A,Anguita C J,Hernanz M C, et al.RFLP-PCR analysis of the aroA gene as a taxonomic tool for the genus Aeromonas[J].FEMS Microbiology Letters, 1997,156:199-204.
- [8] de la Puente Redondo V A,Navas Mé ndez J,García del Blanco N, et al. Typing of Haemophilus parasuis strains by PCR-RFLP analysis of the tbpA gene[J].

- Vet Microbiol, 2003, 92(3):253-262.
- [9] 李军星, 姜平, 王艳, 等. 副猪嗜血杆菌 *tbpA* 基因 PCR-RFLP 分型[J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(1):45-50.
- [10] 李郁, 陈申秒, 王桂军, 等. 副猪嗜血杆菌安徽分离株的致病性与 RELP 基因型的相关性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(8):610-613.
- [11] 蒋征, 李军星, 姜平等. 副猪嗜血杆菌分离与基因分型鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(6):47-49.
- [12] del Río ML, Martí n CB, Navas J, et al. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species[J]. Res Vet Sci, 2006, 80:55-61.
- [13] 薛晓晶, 徐福洲, 史爱华, 等. 副猪嗜血杆菌 *aroA* 基因鉴定及遗传进化分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(8):1100-1103.
- [14] Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22):6503-6508.
- [15] 孙永艳, 申泉, 李艳琴. 肠杆菌基因间重复共有序列及 ERIC-PCR[J]. 生命的化学, 2004, 24(4):288-290.
- [16] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acid Res, 1991, 19:6823-6831.
- [17] Jin-Long Yang, Ming-Shu Wang, An-Chun Cheng. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection[J]. World J Gastroenterol. 2008, May 14;14(18):2872-2876.
- [18] 金莉莉, 董雪, 王秋雨, 等. 副溶血性弧菌重复序列-PCR 分型研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3):389-394.
- [19] Rafiee M, Bara M, Stephens C P, et al. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*[J]. Aust. Vet J, 2000, 78(12):846-849.
- [20] 朱必凤, 杨旭夫, 刘主, 等. 6 株副猪嗜血杆菌基因组 DNA 的 PCR 指纹图谱研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(3):177-179, 184.
- [21] Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6):3140-3145.
- [22] 王洪敏, 柯昌文, 潘武滨, 等. 2005 年广东省临床分离猪链球菌的 MLST 分子分型研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(8):1438-1445.
- [23] Feil E J, Nickerson E K, Chantratita N, et al. Rapid detection of the pandemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST 239, a dominant strain in Asian hospitals[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4):1520-1522.
- [24] Hanage WP, Feil EJ, Brueggemann AB, et al. Multilocus sequence typing: strain characterization, population biology, and patterns of evolutionary descent[M]. Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. David H. Washington DC: ASM Press, 2004. 235-43.
- [25] Leila Medraoui, Mohammed Ater, Ouafae Benhabib, et al. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in north-western Morocco by ISSR and RAPD markers[J]. C R Biologies, 2007 (330):789.

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

抗菌肽 S807 提高肉鸡生产性能的研究

卢宇¹, 王素珍^{2*}, 王凯民³

(1. 江苏省农科院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210095; 2. 海安大兽医站, 江苏 海安 226623; 3. 江苏出入境检验检疫局动物检疫实验室, 江苏 南京 210001)

摘要: 为观察抗菌肽 S807 (强生肽 B[®]) 的功效, 我们进行了肉仔鸡的饲养效果试验。在不同时间段, 分 50~300 mg/kg 等 5 个剂量, 分别添加到颗粒料和粉料给 10~35 日龄肉仔鸡饲喂 7 天以上。结果表明, S807 可预防肉仔鸡腹水症, 肉鸡的死亡率从 16.5% 下降至 7.88%; 每天添加饲喂可使肉鸡平均增重 11.0~16.3g, 生产性能增加 18.6%~22.1%。试验证实抗菌肽可以显著地提高雏鸡成活率, 促进肉仔鸡生长。

关键词: 抗菌肽; 肉鸡; 生产性能

中图分类号: S816.79

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0017-04

The effects of antibiotic peptide S807 on improving the production performance in broilers

Lu Yu¹, Wang Suzhen^{2*}, Wang Kaimin³

(1. National Research Center of Veterinary Biologicals engineering and technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210095, China; 2. Haian Dagong Veterinary Station, Haian 226623, China; 3. Lab of Animal Quarantine, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China.)

Abstract: In order to test the effect of antibiotic peptide S807 (Qiangshengtai B[®]), five chicken groups were fed with five concentrations of Qiangshengtai B[®] from 50mg/kg to 300mg/kg at different time quantum. Ten to thirty-five days old chickens were fed with granules and powders for more than seven days. The results showed that S807 could prevent ascites in broiler chickens. The death rate decreased from 16.5% to 7.88%, the average daily gain increased from 11.0 g to 16.3g and the production performance increased from 18.6% to 22.1%. The antibiotic peptide S807 (Qiangshengtai B[®]) could increase chicken survival rate and promote chicken growth.

Key words: Antibiotic peptide; broiler; production performance

长期以来, 人们一直通过在动物饲料中添加抗生素、抗菌药物类生长促进剂来控制腹泻、促进生长及提高饲料利用率。但是大量使用抗生素、抗菌药物在抑制病原微生物的同时, 也抑杀了动物体内生理性微生物, 破坏了微生物种群或群落间相互制约的微生态平衡, 从而导致动物, 特别是幼龄动物对病原微生物的易感性; 同时, 抗生素、抗菌药物的长期使用会导致耐药菌株的产生, 而这些耐药菌株在一定条件下又能将耐药因子传递给其他细菌, 使其他异种菌也变成耐药菌株。人畜共患病耐药菌株的出现, 让人们对抗生素的副作用认识日益加深, 抗生素在饲料业中的应用, 已面临

着淘汰或禁用的局面。应用无毒无公害的新型抗菌剂代替抗生素作饲料添加剂, 已成为当前国内外研究的热点。

抗菌肽是广泛存在于细菌、植物、软体动物、两栖动物、鱼类、鸟类和哺乳动物体内的一类小分子多肽, 由 20~60 个氨基酸残基组成, 具有广谱杀灭细菌、真菌、病毒和原虫等作用, 是生物先天性免疫的重要组成成份^[1]。与抗生素相比, 抗菌肽具有无污染、无毒副作用、不产生耐药性等优点, 符合绿色环保饲料的要求, 是理想的抗生素替代品。抗菌肽 S807 具有活性高、分子量小、热稳定性好、水溶性好和生物利用度高等特点。本试验旨在通过添加抗

收稿日期: 2010-04-30

*: 通讯作者

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(20080320), 江苏省农业三项工程(sx(2009)138)

表 3 三阶段颗粒料添加结果

| 组别 | 饲料样品 | | | 平均体重(g) | 存活率(%) | 饲料转化率 | 生产评分 | |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------|---------|----------------------|-------|------|-------|
| | D ₀₋₁₄ | D ₁₅₋₃₅ | D ₃₆₋₄₉ | | | | | |
| 试验组 | 1 | A | D-200 | D | 2619±14 ^b | 94.5 | 2.09 | 241.7 |
| | 2 | A | E-300 | D | 2825±20 ^a | 91.5 | 2.14 | 246.5 |
| 对照组 | 3 | A | B | B | 2522±25 ^c | 95.0 | 2.32 | 210.8 |
| | 4 | A | C | C | 2554±35 ^c | 94.5 | 2.26 | 217.9 |

注:每列上标字母不相同者为差异显著(P<0.05),下表同。

表 4 三阶段粉料添加结果

| 组别 | 饲料样品 | | | 平均体重(g) | 存活率(%) | 饲料转化率 | 生产评分 | |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------|---------|-----------------------|-------|------|-------|
| | D ₀₋₁₄ | D ₁₅₋₃₅ | D ₃₆₋₄₉ | | | | | |
| 试验组 | 5 | A | D-150 | D | 2618±34 ^a | 94.0 | 2.08 | 241.5 |
| | 6 | A | D-150 | DM | 2588±52 ^{ab} | 96.5 | 2.13 | 239.3 |
| 对照组 | 7 | A | DM | D | 2547±60 ^b | 90.0 | 2.29 | 204.3 |
| | 8 | A | DM | DM | 2604±57 ^a | 82.0 | 2.37 | 183.9 |

方检验)。添加抗菌肽组雏鸡平均体重比对照组高 16.3 g。50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 和 200 mg/kg 添加组基本一致(表 5)。

2.3 五阶段添加结果 添加抗菌肽组平均生产评分比对照组高 42.3 分,提高了 22.1%;饲养率提高了 8.7%,平均体重增加了 11 g(表 6)。

3 讨论与分析

抗菌肽具有广谱抗菌作用,同时对畜禽具有促生长、保健和治疗疾病的功能,是生物体天然免疫防御系统的重要组成部分。抗菌肽可以使细菌的细胞膜去极化或者形成“孔洞”,造成细胞内含物外流或者肽分子进入细胞内部与 DNA、RNA 等靶

表 5 四阶段添加结果

| 组别 | 饲料样品 | | | | 死亡率(%) | | | 平均体重(g) | |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|------|------|---------|----------------------|
| | D ₀₋₁₄ | D ₁₅₋₂₁ | D ₂₂₋₃₅ | D ₃₆₋₄₉ | 总计 | 腹水 | 其它 | | |
| 试验组 | 9 | A | D-50 | D | D | 8.5 | 7.0 | 1.5 | 2609±31 ^a |
| | 10 | A | D-100 | D | D | 9.0 | 7.0 | 2.0 | 2601±42 ^a |
| | 11 | A | D-150 | D | D | 7.0 | 5.5 | 1.5 | 2611±37 ^a |
| | 12 | A | D-200 | D | D | 7.0 | 5.0 | 2.0 | 2607±28 ^a |
| 对照组 | 13 | A | D | D | D | 18.0 | 13.5 | 4.5 | 2591±43 ^a |
| | 14 | A-200 | D | D | D | 15.0 | 13.0 | 2.0 | 2585±57 ^b |
| | 15 | A | D | D | D-200 | 16.5 | 11.5 | 5.0 | 2596±55 ^a |

表 6 五阶段添加结果

| 组别 | 饲料样品 | | | | | 平均体重(g) | 存活率(%) | 饲料转化率 | 生产评分 |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|
| | D ₀₋₁₄ | D ₁₅₋₂₁ | D ₂₂₋₂₈ | D ₂₉₋₃₅ | D ₃₆₋₄₉ | | | | |
| 试验组 | 16 | A | D-100 | D | D | 2617±35 ^a | 94.0 | 2.09 | 240.0 |
| | 17 | A | D-100 | D-100 | D | 2612±26 ^a | 92.5 | 2.12 | 232.6 |
| | 18 | A | D-100 | D-100 | D-100 | 2617±34 ^a | 94.5 | 2.08 | 242.6 |
| | 19 | A | D | D-100 | D | 2599±28 ^b | 90.5 | 2.13 | 225.4 |
| | 20 | A | D | D-100 | D-100 | 2605±22 ^b | 93.5 | 2.11 | 235.6 |
| | 21 | A | D | D | D-100 | 2594±16 ^b | 92.0 | 2.17 | 224.4 |
| | 22 | A | D | D | D | 2597±26 ^b | 83.5 | 2.34 | 189.1 |
| | 23 | A-100 | D | D | D | 2594±25 ^b | 85.0 | 2.29 | 195.7 |
| | 24 | A | D | D | D | 2588±34 ^c | 86.0 | 2.32 | 195.8 |
| | 对照组 | 25 | A-100 | D | D | D | 2605±61 ^b | 82.0 | 2.37 |

标作用,进而杀死细菌^[2]。本研究结果也表明,给 10-35 日龄肉仔鸡喂养 7 天以上,在代谢能值控制在不小于 3 150 kcal/kg 时,可明显提高肉仔鸡的生长率并缩短其饲养周期,每羽比对照增重 10 g 以上,显著提高雏鸡成活率(提高了 8.62%),也有效预防肉仔鸡腹水症的发生,从而显著地提高肉仔鸡饲养生产性能。与申艳敏^[3]、邓君明^[4]、王雅静^[5]、温刘发^[6]等研究的结果一致。

抗菌肽除具有抗菌、杀菌作用外,还对病毒、真菌、寄生虫等其它病原微生物具有较强的抑制作用,还能与宿主体内某些阳离子蛋白、溶菌酶或抗生素协同作用,增强其抗菌效应^[7]。另外,抗菌肽生物学活性稳定,在高离子强度和酸、碱环境中或 100℃ 加热 10 min 时仍具有杀菌抑菌作用^[8]。本试验所用的抗菌肽 S807(强生肽 B[®])可耐高温(150℃ 以上),能耐受饲料制粒时的高温。

同时,由于抗菌肽本身是来源于养殖动物自身的一种小蛋白,动物对其排异反应很低,而且杀菌作用发挥到一定的程度之后,动物体内的很多蛋白酶就把抗菌肽降解了,检测不到残留物质,对环境没有任何污染,是一种无毒、无害、绿色环保

的产品^[9]。另外,抗菌肽还具有不易出现耐药性突变、分子量小、热稳定性好、水溶性好、作用迅速等特点。

参考文献:

- [1] 王金涛,李金龙,程广东. 抗菌肽的作用机理及基因工程研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2005, (11): 53-55
 - [2] Hancock R E W, Lehrer R. Cationic peptides: A new source of antibiotics[J]. Trends in Biotech, 1998, (16): 82-88.
 - [3] 申艳敏. 人源抗菌肽 LL-37 在毕赤酵母中的分泌表达及其生物活性研究[D]. 南京农业大学硕士论文, 2008. 28-78.
 - [4] 邓君明, 张曦. 肽抗生素——种新型饲料添加剂[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(1): 19-22.
 - [5] 王雅静, 李周权. 抗菌肽制剂代替抗生素作为饲料添加剂的研究[J]. 饲料研究, 2006, (4): 53-55.
 - [6] 温刘发, 何丹林, 张常明, 等. 抗菌肽酵母制剂的生产及其作饲料添加剂应用价值的探讨[J]. 广东蚕业, 2001, 35(2): 34-36.
 - [7] Hancock R E W, Chapple D D. Peptide antibiotics[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43: 1435-1440.
 - [8] 汪以真, 韩新燕, 许梓荣. 哺乳动物抗菌肽及其在畜牧生产上的应用前景[J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(4): 52-54.
 - [9] 陈晓生, 田允波, 贺建华. 抗菌肽在推动当前养禽生产安全体系建设过程中的优势[J]. 畜禽业, 2005, (4): 20-21.
-
- (上接第 4 页)
- [9] Shimaza T. Neuronal regulation of hepatic glucose metabolism in mammals[J]. Diabetes Metab Rev, 1987, (3): 185-206.
 - [10] Moghimzadeh E, Nobin A, Rosengren E. Adrenergic and receptors in the liver[J]. Brain Res Bull, 1982, 9(1-6): 709-714.
 - [11] 李立, 陈刚, 郭永章. 神经递质对肝细胞增殖的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2002, 9(4): 238-241.
 - [12] Kiba T. The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis—recent developments [J]. Digestion, 2002, 66(2): 79-88.
 - [13] Iwai M, Shimazu T. Effects of ventromedial and lateral hypothalamic stimulation on chemically induced liver injury in rats[J]. Life Sci, 1988, 42(19): 1833-1840.
 - [14] Beckh K, Arnold R. Regulation of bile secretion by sympathetic nerves in perfused rat liver[J]. Am J Physiol, 1991, 261(5 Pt 1): G775-780.
 - [15] Shimazu T. Progress and perspective in neuro-hepatology[M]. Liver Innervation, 1996, 57.
 - [16] Moore M C, Cherrington A D. Regulation of net hepatic glucose uptake: interaction of neural and pancreatic mechanisms[J]. Reprod Nutr Dev, 1996, 36(4): 399-406.
 - [17] Cardin S, Walmsley K, Neal D W, et al. Involvement of the vagus nerves in the regulation of basal hepatic glucose production in conscious dogs[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 283(5): 958-964.
 - [18] Sakaguchi T, Liu L. Hepatic branch vagotomy can block liver regeneration enhanced by ursodesoxycholic acid in 66% hepatectomized rats[J]. Auton Neurosci, 2002, 99(1): 54-57.
 - [19] Kiba T, Saito S, Numata K, et al. Expression of apoptosis on rat liver by hepatic vagus hyperactivity after ventromedial hypothalamic lesioning[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(5): 958.
 - [20] Hiramoto T, Chida Y, Sonoda J, et al. The hepatic vagus nerve attenuates Fas-induced apoptosis in the mouse liver via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor[J]. Gastroenterology, 2008, 134(7): 2122-2131.

猪精液冷冻技术

李志鹏, 陈兴宏, 张 静

(广东宝兴农牧科技有限公司, 广东 兴宁 514571)

中图分类号: S814.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0021-03

精液冷冻保存技术(Semen freezing)是将精液特殊处理后,通过液氮(-196℃)、干冰(-79℃)或其它冷源冷冻,超低温保存,使精液达到长期保存。精液冷冻保存技术的主要原理是精子在冷冻状态下,代谢几乎停止,生命保持相对静止状态,升温后又能复苏而不失去受精能力。

精液冷冻保存技术解决了精液难以长期保存的问题,其优点为:①使精液不受时间、地域和种畜生命限制,便于开展省际、国际间运输和品种交流,极大地提高优良公畜利用率,加速品种育成和改良;②引进国外高性能公猪冻精取代引进活体公猪,可节省外汇支出;③对优良种畜在短期进行后裔测定,保留和恢复某一品种或个体优良遗传特性;④冷冻精液通过后裔测定或疾病检测,保障遗传进展的稳定和生物安全;⑤建立基因库,保护地方品种和珍稀濒危品种资源。因此具有重要的应用潜力和广阔的应用前景^[1~2]。

1 猪精液冷冻保存技术研究简况

Ivanov 在 1926-1927 年首次尝试进行猪冷冻精液保存技术研究及冻精人工授精,之后,Milovanov 等在 1930-1936 年进行同样试验,并最早成功地配制了猪精液冷冻的稀释液(葡萄糖-硫酸盐和葡萄糖-酒石酸盐)。早期的猪精液冷冻试验结果表明,冷冻后的精液中,只有一部分精子能够存活,并且冷冻保存比液态保存对猪精子的损伤更严重,因为温度下降对猪精子质膜、超微结构和生化组成造成损伤。1949 年,甘油对精子的抗冻保护作用被发现,推动了猪精液冷冻保存技术发展。1956 年,Polge^[3]首次报道成功得到冻精人工授精出生的仔猪。1975 年,Purse^[4]发明简便的猪精液冷冻和解冻方法,并在同年报道通过对 23 头青年母猪进行颗粒状冷冻精液解冻后人工授精,11 头于配种后 48 h 后剖检,配种受胎率为 45.45%,另外 12 头于配种后 25~30 d 后剖检,配种受胎率为

83.33%。但由于受胎率和产仔数都明显低于本交,直到 2000 年,全世界冻精的应用估计还不到猪人工授精总量的 1%^[5]。从外国进口的冷冻精液大多用于扩大本国猪品种的遗传资源和进行杂交改良^[6]。

虽然猪精液冷冻保存技术发展缓慢,但国内外有关专家始终在不懈探索。随着各种新的检测手段的建立,可检测到精子细胞质膜化学组成变化、通透性改变、表面基因的不同以及各种冷冻损伤,为分析各种因素的影响提供了更确凿的科学依据。2002 年,Thurston 等^[7]分析了质膜表面基因限制性片段多态性,发现其中 16 个片段对冷冻结果影响较大。从而可看出个体差异对冷冻效果的影响。

2006 年,Ricker 等^[8]用傅氏转换红外光谱仪(FTIR)和扫描电镜(SEM)检测到在低温下质膜膜相的变化。由于膜相变化,引起了膜通透性改变、活力下降、信号通路改变,直至引起细胞死亡。Brouwer 等^[9]监测和定位了脂质过氧化物的代谢;Fraser 等^[10]用改良的中性彗星实验评价 DNA 的损伤。DNA 的完整对于自然受精和人工授精的受精率、胚胎的正常发育、胎儿和后代的生长至关重要。

2 猪精子冷冻特点和冷冻机理

2.1 猪精子冷冻特点 猪的精液与其他哺乳动物存在较大差异,其精液量大,精子对冷休克特别敏感。影响精子质膜流动性和抗冷休克能力的因素包括:精子膜上胆固醇和磷脂的比例、烃链的饱和程度、蛋白质和磷脂的比例等^[11]。牛精子对冷休克不敏感而猪精子对冷休克敏感,主要原因:第一,精子膜上磷脂组分,主要调节膜流动性稳态的磷脂-磷脂酰胆碱在猪精子中的含量低于牛精子;第二,精子膜上胆固醇/磷脂及胆固醇分布,猪精子胆固醇/磷脂较低,胆固醇分布量外膜大于内膜。内膜对冷休克敏感,降温过程中,膜磷脂的侧移受到限制,使膜磷脂从液晶相转为凝胶相;同时,由于膜上磷脂相变温度不同,导致膜成份侧

移和重排,膜表面脂质分离,蛋白质不可逆凝集;另外,精子膜状态的改变导致游离 Ca^{2+} 从细胞外流入细胞内,刺激依赖 Ca^{2+} 的细胞提前获能(也称假成熟)^[12]。此外,受猪精子遗传特点影响,冻精的体外活力和解冻后受精等能力存在个体差异性。

2.2 猪精子冷冻机制 冷冻过程是精细胞脱水过程,此过程中细胞受到化学性和物理性损伤:第一、化学性损伤:冷冻过程中细胞外溶液形成部分冰晶,使未结冰部分形成高渗溶液,精子内水分向外渗透,导致精子脱水、淹渍而失去活力;第二、物理性损伤:冰晶对细胞膜及细胞内部结构产生机械性损伤,导致细胞死亡。冷冻过程中,细胞内形成的冰晶的大小和数量影响细胞受损伤程度,微晶状态的冰晶不会损伤细胞,而对精细胞造成物理性损伤的大冰晶会导致细胞损伤或死亡^[13]。

3 影响猪冷冻精液因素

3.1 稀释液和冷冻保护剂 在温度变化过程中,精液对精子的保护能力是有限的。为此,进行精液冷冻保存时要配合稀释液。稀释液是精子的营养剂和保护剂,通常由能量物质(糖类)、低温保护剂(蛋白质、脂蛋白等)、防冻保护剂(甘油、二甲基亚砷等)、添加剂(十二烷基硫酸酯等)、维持渗透压物质(柠檬酸钠、Tris 等)和抗菌素(青霉素、链霉素等)组成。

(1)糖类和缓冲物质:稀释液中使用的糖类主要有葡萄糖、果糖、乳糖。胡健宏等^[14]发现,在传统 Tris-柠檬酸-葡萄糖稀释液基础上添加 25%海藻糖,能显著($P < 0.05$)改善和提高猪精液的冷冻效果,解冻后猪精子活力、活率、线粒体活性、质膜以及顶体完整性分别提高 41.38%、46.34%、44.56%、43.51%和 64.09%。

(2)卵黄:卵黄中保护精子的有效成分是低密度脂蛋白(LDL)。保护作用机制存在三组假说。一种假说认为 LDL 与精子膜结合通过稳定膜而起保护作用。另一种假说认为 LDL 中的磷脂通过在精子表面形成一层保护膜或者替换在冷冻过程中丢失的膜磷脂保护精子。第三种假想是 LDL 与精浆中的有害阳离子肽类竞争结合精子膜而发挥保护作用^[15]。

(3)甘油:是精液冷冻过程中最重要和最常用的冷冻保护剂,冷冻过程中,精细胞主要受到冰晶的物理和化学损伤使精细胞处于脱水状态,导致细胞死亡,甘油的理化特性使其能减少冰晶对细胞的损伤。但甘油对精子有毒害作用,所以甘油添

加浓度、添加温度和平衡时间直接影响猪精子冷冻后的存活率。2006 年,姜兴刚等^[16]研究表明添加 2%和 4%甘油对猪精子冷冻保护作用显著($P < 0.05$)高于添加 6%和 8%甘油组。1996 年,Fiser 等^[17]对保存在 0.5 mL 细管中的猪精液用不同甘油浓度(0~6%)和不同平衡时间进行研究,结果表明:在 5℃下平衡 4 h 后进行冷冻,解冻后精子活率和活动精子的顶体完整率最高。

(4)其他添加物质:为了提高猪精液的冷冻效果,研究者尝试在稀释液中添加各类物质以改善精子外环境的理化特性,提高冻精解冻后受精率。常用的添加物有十二烷基硫酸酯及其类似物、2-羟脯氨酰- β -环化糊精、透明质酸、N-乙酰基-D-葡萄糖胺、 α -维生素等。李青旺等^[18]在猪精液冷冻稀释液中添加 400 mg/L 安钠咖,精子冻后活率和生存指数显著高于对照和添加 VC 两组($P < 0.01$)。

3.2 精液平衡 2006 年,姜兴刚等^[16]研究表明平衡时间为 60 min 和 90 min 时,精子活力显著^[17]高于平衡时间为 0、30 min 和 120 min 组,且 60 min 组精子活力最高。

3.3 冷冻 目前,猪精液冷冻的方法基本有两种,即 Beltsville 和 Westendorf 法。前者是将富含精子的部分采集后与精清滞留 2 h,然后离心,降温 3 h 后在干冰上制成 0.15~0.20 mL 的颗粒冻精;后者是将精液按 1:2 稀释,然后在稀释液中降温,最后制备成细管冻精。后来研究者根据研究结果对细管冻精进行了改进,如 2 mL 细管冻精、5 mL 塑料袋和 5 mL 大管等剂型。

Fiser 等^[17]1996 年对猪精液的研究中表明甘油浓度和冷冻速度之间的相互影响非常重要。他们对冷冻速度从 1℃/min 到 1500℃/min 的范围对猪精子存活曲线进行了研究,发现降低甘油浓度可获得较好的冷冻速度。有效的冷冻需达到三个因素的最佳组合:甘油浓度、冷冻速率和解冻速率,而这三个因素都与冷冻分装的细管型号有关。1995,Pursel V 等^[19]研究表明,不同剂型最佳组合分别为:0.25mL 细管采用 50℃/min,1.5%甘油浓度;0.5mL 细管采用 30℃/min,3%甘油浓度;5 mL 大型细管采用 16℃/min,3.3%甘油浓度。

3.4 解冻 解冻操作程序与冷冻过程是相对应的,解冻效果受冷冻速率影响。理论上讲,快冻应该快融,其程度视不同类型细胞而略有差异。精子的冷冻损伤主要是因冷冻过程中未达到最佳冷冻

速率引起。以最佳冷冻速率冷冻精子,而后提高解冻速率可增加解冻后精子活率和顶体完整率。

Có rdova-Izquierdo 等^[20]研究 5 mL 细管冷冻猪精液,两种不同解冻温度 42℃、50℃经 40s 解冻后的精子质量。结果表明,42℃解冻后精子活率显著($P < 0.05$)低于 50℃,二者的顶体完整率、穿卵率,单精入卵率和多精入卵率相似。

3.5 冷冻剂型 在猪精液冷冻保存研究中,分装型号有:颗粒、5 mL 大型细管、5 mL 平管或平胶袋、4-5 mL 铝袋等。Wongtawan 等^[21]将猪精液分别用 0.5 mL 细管、2.8 mL 多聚平管(4 个 0.7 mL 平管组成)冷冻猪精液,解冻后精子活力分别为 0.428、0.443。5 mL 细管、平管和塑料袋冻精含有 1 头份精子数量,可减少精液分装和解冻时间,使输精操作更简便、省时,因此,值得更深入研究。

3.6 保存 猪冷冻精液的保存必须使其全部浸入液氮中,使用过程中为了缩短冷冻精液离开液氮时间,将液氮罐放在距离解冻设备或水浴锅最近的位置。冷冻精液暴露于空气中超过 5s 导致精液品质下降,因此,整个过程控制在 5s 内。

4 发展前景

随着分子生物学、细胞生物学及低温生物学的不断渗透与结合,猪冷冻精液保存技术将日趋成熟,生产实践中,提高优良公猪利用率,减少疾病传播,保护地方优良品种和珍稀濒危品种资源,加快育种进程,提高母猪受胎率和增加产仔数等方面具有重要意义,因此具有重要的研究价值和广阔的市场前景。

参考文献:

- [1] 周佳勃,岳奎忠,孙兴参,等.猪精液冷冻技术的研究进展[J].中国兽医学报,2002,22(3):295-299.
- [2] 嵯艳书,王坚,刘铁铮.猪精液冷冻保存研究进展[J].江苏农业科学,2006,(3):136-140.
- [3] Polge C. Artificial insemination in pigs[J]. Vet Rec, 1956, 68: 62-76.
- [4] Pursel V G, Johnson L A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure[J]. J Anim Sci, 1975, 40: 99-102.
- [5] Thibier M, Wagner H G. World statistics for artificial insemination in cattle[C]. Proc 14th Int Congr Anim Reprod, 2000, 22: 76.
- [6] Soede N M. Oestrus expression and timing of ovulation in pigs[J]. British Pig Science, 1998, 39: 187-194.
- [7] Thurston L M, Siggins K, Mileham A J, et al. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation[J]. Biol Reprod, 2002, 66: 545-554.
- [8] Ricker J V, Linfor J J, Delfino W J, et al. Bull. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based[J]. Cryopro Bio Reprod, 2006, 74: 359-365.
- [9] Brouwers J F, Silva P F N, Gadella B M. New assays for detection and location of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing[J]. Theriogenology, 2005, 63: 458-469.
- [10] Fraser L, Strzezek J. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing[J]. Anim Reprod Sci, 2007, 99: 317-329.
- [11] Breining E, Beorlegui N B, Flaherty O C M. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen[J]. Theriogenology, 2005, 63(8): 2126-2135.
- [12] De Leeuw F E, Colenbrander B, Verkleij A J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury[J]. Reprod Domest Anim, 1990, 1(Suppl): 95-104.
- [13] Yi Y J, Im G S, Park C S. Lactose-egg yolk diluter supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm[J]. Animal Reproduction Science, 2002, 74(3/4): 187-194.
- [14] 胡建宏,李青旺,江中良等.海藻糖对猪精液冷冻保存效果的影响[J].畜牧兽医学报,2006,37(12):1297-1303.
- [15] 赵连真,李孝娟.卵黄对精子保护作用的机制[J].黑龙江动物繁殖,2006,14(4):23.
- [16] 姜兴刚,赵桂英,绍禹等.冷冻前离心方法、平衡时间、甘油浓度对猪精子冷冻保存的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2008,6:42-43.
- [17] Fiser P S, Fairfull R W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 mL straws[J]. Molecular Reproduction Development, 1996, 25: 123-129.
- [18] 李青旺,江中良,王立强,等.猪精液冷冻保存的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):63-66.
- [19] Pursel V G, Park C S. Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa[J]. Swedish University Agricultural Sciences, Uppsala, 1995: 147-166.
- [20] Có rdova-Izquierdo A, Oliva J H, Lleó B. Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 mL straws[J]. Anim Reprod Sci, 2006, 92(1-2): 145-154.
- [21] Tuempong Wongtawan, Fernando Saravia, Margareta Walgren. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses[J]. Theriogenology, 2006, 65(4): 773-787.

保育猪呼吸道疾病的病因与防控措施

李中兴

(广东省湛江农垦畜牧有限公司幸福分公司, 广东 湛江 524261)

中图分类号: S853.57

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0024-01

近年来,许多规模化猪场出现保育猪呼吸急促、困难(腹式呼吸),打喷嚏,咳嗽,食欲减退,皮肤苍白或黄疸,精神沉郁,喜扎堆,怕冷,有的还出现腹泻等表现和呼吸道疾病。由于治疗不当或不及时,致使猪只发展成为僵猪,甚至死亡,给养猪业造成重大损失。笔者将其病因与防控,进行分析阐述,望能对养猪同行有所帮助。

1 保育猪呼吸道疾病的病因

1.1 种猪群健康状况所致 俗话说:“公猪好,好一坡,母猪好,好一窝”。这句话在生产实践中得到证实,种猪群存在呼吸道病原(如蓝耳病、猪伪狂犬、猪流感、猪萎鼻等),其保育猪更易患呼吸道疾病。

1.2 仔猪免疫力低下所致 仔猪获得免疫保护主要源于两个方面:被动免疫和主动免疫。被动免疫来源于母乳,仔猪断奶前后体内的母源抗体几乎降到最低水平,同时仔猪在3周龄以前,主动免疫系统还没成熟。产生主动免疫抗体大约在3周后才开始,但是到4~5周龄时,所产生的抗体仍然较少。加上体温调节能力尚未发育完善,若保温不够或通风不畅,则抵抗力更低,因此仔猪最容易感染呼吸道疾病(如猪流感、气喘病、传染性胸膜肺炎、猪肺疫等)。

1.3 应激因素所致 仔猪断奶、转栏、更换饲料、气候环境改变及注射疫苗等都可促使仔猪发生呼吸道疾病。笔者曾经历过,必须高度重视。

2 保育猪呼吸道疾病的防控

2.1 预防

2.1.1 从种猪群抓起 选择无呼吸道病病原的种猪,在选种和引种时把关。①每年定期(一年两次,半年为一次),对全场所有种猪检测,发现有呼吸道病原的种猪,采取淘汰处理或注射疫苗及采取相应措施后,进行复检,确认健康,才继续作种

用。特别注重后备母猪的培育(曾有呼吸道疾病的猪,不应列入选种计划)。②猪场如需引种,一定要从无呼吸道病病原的猪场引进,并进行隔离观察一至二个月后,进行必要的免疫,再经检测,有呼吸道病患时,坚持淘汰处理,为减少保育猪患呼吸道疾病打下坚实的基础。③根据本场具体情况,做好各类疫苗免疫工作。在母猪产前4周时开始按计划完成猪伪狂犬病、蓝耳病、传染性胃肠炎、猪瘟等疫苗的注射,使母猪处于高免状态。④母猪在产前、产后1周,应用80%支原净125g+金霉素300g+阿莫西林200g或2%纽弗罗1500g+泰乐菌素250g/吨饲料进行混饲,对预防呼吸道疾病有显著作用。

2.1.2 重视仔猪的饲养管理 仔猪在3、7、21d龄分别肌注得米先0.5~1mL/头·次,可使仔猪免受呼吸道疾病感染。①按仔猪抗体水平确定,在仔猪18~30d龄期间,分别注射猪伪狂犬病、蓝耳病、猪瘟疫苗。通过疫苗的免疫注射,可提高仔猪自身免疫力,降低呼吸道病的发生。②减少应激因素:仔猪断奶前后、转栏前后,加药物保健显得尤为重要。选用泰农1250g+磺胺二甲110g/吨饲料混饲,连用7~10d。仔猪更换饲料时,必须采取过渡措施,即:第一天,前期料和后期料按7:3混合;第二天,前期料和后期料比例为5:5;第三天,前期料和后期料比例为3:7;第四天完全为后期料。转换饲料过程中适当控料,喂量为平时七、八成。注射疫苗时,在仔猪饮水中添加多维200g/1000kg水,连用7d,可增强保育猪的抗病能力。③降低饲养密度,每头仔猪应有0.4m²的生活空间,避免不同来源和日龄相差太大的猪只混群饲养。应按大小,强弱分群饲养。④加强栏舍通

(下转第45页)

林芝地区一例鸡沙门氏菌的分离与鉴定

鲁志平, 色珠*, 姚海潮, 次仁多吉, 曾江勇, 刘建枝, 拉巴次旦, 吴金措姆
(西藏自治区农科院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009)

摘要: 2009年5月, 林芝地区某个体养鸡户的鸡发病死亡。通过剖检病死鸡、病原菌的分离培养、生化试验、致病性试验和血清学试验等, 鉴定出病料中含有鸡沙门氏菌, 结合临床表现诊断为鸡白痢。

关键词: 鸡; 沙门氏菌病; 分离; 鉴定

中图分类号: S854.4⁴

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0025-02

Isolation and identification of one strain of *Salmonella gallinarum* in Linzhi area, Tibet

Lu Zhiping, Se Zhu*, Yao Haichao, Ci Renduoji, Zeng Jiangyong, Liu Jianzhi, La Bacidan, Wu Jincuomu
(Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Tibet Academy of Agricultural and Animal Sciences, Lasa 850009, China)

Abstract: In May 2009, chickens from an individual farmer in Linzhi were ill and died. The chickens were dissected and pathogens were isolated and cultured from them. Biochemical test, pathogenicity test and serological test were done also. One strain of *Salmonella gallinarum* was isolated and identified. Combined with the clinical symptoms the disease was diagnosed pullorum disease.

Key words: Chicken; *Salmonella gallinarum*; isolation; identification

禽沙门氏菌病是由沙门氏菌属中的一种或多种细菌引起禽类急性或慢性疾病的总称。感染禽类的主要有鼠伤寒沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸭沙门氏菌。在家禽中, 本病最常见于鸡、火鸡、鸭、鸽子等, 呈地方流行性。幼禽对该病最为易感, 常在5周龄内感染发病, 而1月龄以上的禽类有较强的抵抗力, 一般不引起死亡, 呈隐性带菌。该病在幼禽多呈急性或亚急性经过。雏禽发病后, 表现为闭眼呆立, 翅下垂, 怕冷扎堆, 饮水增加, 食欲废绝, 排出灰白色稀糊状粪便并污染肛门周围的绒毛。

2009年5月, 林芝地区某个体养鸡户的鸡发病死亡。临床表现为精神萎靡, 嗜眠, 食欲降低或消失, 绒毛松乱, 缩颈, 眼半闭, 双翅下垂, 畏寒。患病雏鸡的冠、肉髯及脚均泛白, 喙部尖削, 瘦小体弱, 呆立不动。病鸡体温升高, 呼吸困难, 最后衰竭死亡。作者对病死鸡进行病原分离培养与鉴定, 并提出相应防治措施。现报告如下:

1 材料

1.1 材料 自然病死鸡来源于林芝地区某个体养

鸡户。该养鸡户共饲养鸡450多只, 共发病46只, 死亡12只, 发病率10%, 病死率达26.1%。

1.2 试验动物 15只健康雏鸡, 购自林芝地区八一镇香港路农贸市场。

1.3 主要化学试剂 琼脂粉、牛肉浸膏、蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钾、氢氧化钠、甲醛溶液、麦康凯琼脂、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、革兰氏染色液等。

1.4 仪器 超净工作台、压力消毒器、空气浴震荡器、电子天平、显微镜等。

1.5 培养基制备 普通肉汤培养基、熟肉培养基、琼脂培养基、鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂、糖半固体培养基、基质培养基、甲基红培养基、硫化氢培养基按有关文献制备^[1]。

2 方法

2.1 病原分离鉴定

2.1.1 剖检 取自然病死鸡的新鲜尸体3只, 采集肝脏、脾脏和肾脏病料; 再剪开胸腔, 采集心脏和肺脏病料, 并观察其病理变化^[2]。

2.1.2 动物接种 将病料制成1:5的匀浆, 加入青

霉素和链霉素各 5 000 IU/mL, 置 4℃ 冰箱中作用 2 h, 用灭菌注射器吸取作用后的匀浆, 给 5 只鸡肌肉注射 1 mL^[3], 观察至 14 d。

2.1.3 形态观察 取病料进行涂片或触片, 用革兰氏染色液进行染色、镜检。

2.1.4 分离培养 无菌取心血、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏接种普通肉汤、熟肉基、鲜血琼脂和麦康凯琼脂培养基上, 置 37℃ 培养 20 h, 取培养物作革兰氏染色镜检。先用肉眼选择鲜血琼脂平板上圆形、光滑、边缘整齐、大小适中的单个菌落 5 个, 置低倍显微镜下观察所选择的菌落是否为圆形、光滑、边缘整齐的菌落。再将菌落作革兰氏染色镜检。

2.1.5 纯培养 将革兰氏阴性的 5 个单个菌落分别进行纯培养。置 37℃ 培养 20 h, 取纯培养物做涂片、干燥、固定和革兰氏染色, 镜检后备用^[4]。

2.2 生化试验

2.2.1 糖类分解试验 取纯培养物分别穿刺接种乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、葡萄糖半固体培养基, 置 37℃ 连续培养 7 d, 每天观察记录结果。

2.2.2 靛基质试验 取纯培养物接种靛基质培养基, 置 37℃ 连续培养 2~5 d, 于培养物中加入二甲苯 2~3 mL, 摇匀, 静置片刻后, 沿试管加入 Kovac 氏试剂 2 mL^[5], 观察记录结果。

2.2.3 甲基红(MR)试验 取纯培养物接种甲基红培养基, 置 37℃ 培养 2~3 d, 于培养物中加入甲基红试剂 3~5 滴, 充分混匀, 每天观察记录结果。

2.2.4 硫化氢试验 取纯培养物穿刺接种醋酸铅琼脂培养基中, 置 37℃ 培养 2~5 d, 观察记录结果^[6]。

2.3 致病性试验 用灭菌生理盐水将纯培养物洗下, 制成悬液, 肌肉注射雏鸡 5 只, 0.5 mL/ 只, 对照组 5 只肌肉接种灭菌生理盐水 0.5 mL/ 只, 观察致病情况, 并从病死雏鸡体内分离病原菌^[7]。

2.4 血清学试验 取洁净的玻璃片用记号笔划分三格, 每格滴一滴灭菌的 0.5% 石碳酸生理盐水, 再用灭菌接种环勾取细菌纯培养物与 0.5% 石碳酸生理盐水混匀; 第一格加入大肠埃希氏菌阳性血清, 第二格加入沙门氏菌属诊断血清(O 血清的 A~F 群)。第三格为对照组, 加入阴性血清。观察结果^[8]。

2.5 治疗 根据药敏试验结果, 立即对发病鸡肌肉注射丁氨卡那霉素, 每天 1 次, 连用 3~5 d; 同时, 使用氟哌酸饮水, 并在饮水中添加多维, 对周围环境及水污染的用具进行消毒。

3 结果

3.1 剖检 病死鸡肝脏充血, 脾脏、肾脏和肠系膜

淋巴结有不同程度的出血; 肺脏出血和胸膜肺炎; 心脏表面有小点出血。

3.2 动物接种 病料匀浆经青霉素和链霉素作用后, 注射给雏鸡 5 只, 观察至 14 d, 5 只雏鸡的精神、食欲、粪便均正常, 雏鸡均健康存活。

3.3 形态观察 心血涂片, 肝脏、脾脏、肺脏和肾脏触片, 镜检可见到两端钝圆的 G⁻ 球杆菌。分离的细菌镜检, 可见到两端钝圆的 G⁻ 球杆菌。

3.4 分离培养 病料接种普通肉汤和熟肉基上, 培养后液体不浑浊; 接种麦康凯琼脂培养基, 细菌生长贫瘠; 接种鲜血琼脂培养基上, 可见有灰白色露珠状、不透明的小菌落。菌落圆形、边缘整齐、表面光滑、湿润、不溶血。

3.5 生化试验 病料分离的纯培养物发酵葡萄糖产酸产气; 发酵甘露醇产酸; 不发酵乳糖、麦芽糖和蔗糖。甲基红(MR) 试验阳性, 硫化氢试验阳性, 靛基质试验为阴性。

3.6 致病性试验 纯培养物接种雏鸡后可见雏鸡体温升高(40.5~42.0℃), 精神不振, 食欲废绝。雏鸡肛门周围粪便污染。雏鸡于接种后 24~48 h 衰竭而死亡。剖检病死雏鸡, 可见内脏器官呈败血症的病理变化。从病死雏鸡的心血、肝、脾、肺、肾脏中再次分离得到该菌。对照组 5 只雏鸡均健活。

3.7 血清学试验 第一格菌液与大肠埃希氏菌阳性血清未出现凝集现象; 第二格菌液与沙门氏菌属诊断血清(O 血清的 A~F 群) 出现凝集现象; 第三格菌液与阴性血清的对照没有出现菌体自凝现象。

3.8 治疗 1 周后病情得到控制。病鸡饮水、采食等逐渐恢复正常, 康复后未见再发病。

参考文献:

- [1] 李六金, 李健强. 兽医微生物学实验实习指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1999: 36-38.
- [2] 王育抗. 鸡副伤寒病的诊治[J]. 中国家禽, 2004, (2): 24-25.
- [3] 徐纯厚. 鸡沙门氏菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 1998, (3): 130-131.
- [4] 文其乙, 张如宽. 鸡沙门氏菌病原分离与鉴定[J]. 中国家禽, 1989, (1): 30-31.
- [5] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 52-58.
- [6] 程松高. 微生物学及检验技术[M]. 广州: 广东人民出版社, 1979: 46.
- [7] 唐桂运, 武华, 译. 禽病原分离鉴定实验室手册[M]. 第三版. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 10.
- [8] 曹澍泽. 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 23.

种鸡人工授精易引发的常见疾病及其预防措施

吴群彬, 王锐彬, 庄友初

(汕头市白沙禽畜原种研究所, 广东 汕头 515800)

中图分类号: S814.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0027-02

种鸡人工授精技术现已被普遍使用,在生产上着重大的作用。它可大大减少种公鸡的饲养数量,节约饲料和饲养费用,更重要的是能充分利用优良种公鸡,扩大良种公鸡的利用率,提高鸡群生产性能与价值效益。然而在种鸡人工授精过程中,如果不严格按照科学的规程进行操作,不但会影响受精率、孵化率和雏鸡的质量,而且会给种母鸡留下多种疾病隐患。现将由于人工授精不当所引起的常见疾病及预防措施介绍如下:

1 症状及病理变化

1.1 泄殖腔炎 病鸡无明显异常。主要表现为肛门红肿,肛门边缘常有假膜形成。严重时肛门组织发生溃烂,形成溃疡。可继发泄殖腔垂脱,并被啄肛。病鸡在没有得到及时治疗时,会从肛门流出一种白色粘性分泌物,具有恶臭气味,周围羽毛受污染。其他没有明显病理症状。有的病鸡也能产蛋,但蛋壳有血斑。

1.2 输卵管炎 主要表现在产蛋下降,畸形蛋增多,受精率下降等,对生产性能影响较大。本病多发生于初产或高产的青年母鸡。病鸡发热,羽毛逆立,两翅下垂,喜卧,呈昏睡状。若炎症蔓延至腹腔时,可引起腹膜炎,往往是引起难产、输卵管脱垂和被啄肛的一个主要原因。患病鸡经常从肛门排出黄白色脓样分泌物,使肛门周围及肛下羽毛被污染。产蛋困难,蛋壳上常带有血迹,所产的蛋大多异常。发病鸡不宜留作种用。剖检可见腹膜炎及子宫炎病变,输卵管充满黄白色或白色浓稠的分泌物,分泌物有时呈干酪样或形成干燥团块。

1.3 卵黄性腹膜炎 急性病例呈现病状后不久就死亡。慢性病例食欲不振,病鸡喜卧,羽毛蓬松,下痢,鸡冠、颜面和肉髯等苍白。腹部肿大下垂,触

之松软,感觉到有半液体状或较浓稠的流体。病鸡停止产蛋,很快死亡。剖检可见腹腔中积有棕黄色或脓样的卵黄液,有腐败酸臭味。有的腹腔呈蓝黑色,常可见到团块状的变性卵黄。有的腹腔器官严重粘连,积有浓稠恶臭液体。

1.4 肝脏破裂出血症 患鸡在输完精后不久即突然死亡,有的在次日早晨发现已死于笼内。剖检可见胸腹肌苍白,腹腔内有大量的血液或血凝块,肝脏破裂,破裂处有血凝块覆盖。

1.5 惊恐应激性反应 起初少数鸡只兴奋不安,“嘎嘎”高声鸣叫,在鸡笼内不停地跳动乱闯,当整个鸡群听到同伴的惊叫声后,惊恐万状,齐声惊叫,表现出惊恐神经质骚乱的“炸群”现象。因鸡群间互相踩踏造成鸡只受伤,甚至出现突然死亡。应激过后,鸡群表现食欲减退,产蛋量显著下降,破损蛋增多。

1.6 脚趾病 患病鸡一脚或两脚发炎、肿胀、化脓,甚至骨折。造成运动障碍,跛行、瘫痪等。个别患病鸡因饮食废绝,逐渐消瘦并停止产蛋。

2 病因

2.1 在给母鸡人工授精时,授精人员(包括输精员和翻肛员)动作生硬粗暴,操作不当,工作马虎,往往是导致各种生殖道炎症及鸡群应激性疾病的主要因素。譬如,输精管插入时用力过大、插入过深;输精管玻璃嘴破裂还继续使用;翻肛员手势不正确,翻肛不到位,输精管插入受阻而损伤泄殖腔引起炎症;母鸡将要产蛋时,翻肛员未待母鸡把蛋产出而硬把蛋推压出产道,强行进行授精;或者翻肛用力过猛使外生殖道外翻过度,收缩复原困难等。上述原因常常造成输精管内皮组织受损伤,导致泄殖腔炎、输卵管炎等疾病的发生。

2.2 翻肛员在捕捉母鸡进行人工授精时,由于母鸡受惊拼命撞笼逃避,以致卵巢上排出的卵子不能正常地落入输卵管漏斗部,而是落到腹腔中;或者是在捕捉母鸡时随意改变了母鸡的正常体位,特别是体位反转,呈仰卧状时,这样极易造成卵直接排入腹腔内;或者是由于其他粗暴驱赶等原因引起输卵管破裂,从而造成腹腔发生炎症引起卵黄性腹膜炎。

2.3 在捕捉或保定母鸡时用力不当,或在输精中由于母鸡剧烈挣扎而摔落地面,或是在给母鸡输精后,不是轻柔的送回笼中,而是粗暴的把鸡抛回笼内等原因造成肝脏损伤破裂,大量出血致死。

2.4 在人工授精期间,工作人员高声喊叫;在鸡舍内快速跑动;穿戴衣物不一致;捉鸡动作粗鲁造成鸡只惊叫等因素。鸡群受惊吓发生“炸群”,母鸡因剧烈骚乱跳动,也是导致肝脏出血症和应激性反应的重要原因。

2.5 导致脚趾病的主要原因是由于笼养种鸡长期缺乏运动;在开产后或产蛋高峰期后,钙、磷、维生素A、D等的缺乏。使其容易受到外来因素所引起的机械性损伤,造成患病鸡两腿或脚趾发生炎症、肿胀、化脓,并易致葡萄球菌、链球菌等的侵袭。

3 预防措施

由于导致以上各种疾病的病因甚多,也较复杂,所以在人工授精期间,应该有针对性地采取综合防治措施,才能取得较好的预防效果。

3.1 首先应该加强对授精人员工作责任心的教育;其次应加强对授精人员的技术培训,使其熟练掌握输精、翻肛等技术要求。

3.2 在进行人工授精时,输精人员与翻肛人员要配合默契,动作要轻柔,操作要认真细致,用力要均匀。捕捉鸡时切记不可生擒硬按,应轻抓轻放,输精时动作不能粗暴。

3.3 工作人员所穿戴的工作服要统一,不要随意更换;行走时动作要轻便,切不可高声喊叫,输精人员组合要稳定,不要经常换人。

3.4 在输精时要保持母鸡的正常交配体位,即是背朝上腹朝下的站立姿势,不要随意倾斜,甚至使体位反转;杜绝手握母鸡两爪倒提的推压做法。

3.5 严格把握授精时间,因母鸡产蛋时间大多在上午至下午3时前,人工授精时间在下午3时后进行较好。输精后才产蛋的个别鸡只,应待其产蛋后才输精。

3.6 平时应加强对鸡群的饲养管理,注意加强卫生消毒,改善鸡舍环境卫生,改善饲料营养,补充多种维生素等抗应激性药物。要注意笼养种母鸡能量不能过高,因其运动受限制易致能量过剩,脂肪过度沉积,是诱发母鸡脂肪肝综合症的病因,从而加剧肝脏破裂出血症的发生;要注意母鸡开产后,特别是在产蛋高峰期后,适当补充钙、磷、维生素A、D等。

3.7 对于笼养要注意不让尖锐的金属异物或杂物损伤母鸡腿脚,笼具底部要平整,笼底网眼要合理,以防受机械性创伤等。

3.8 隔离患病鸡。应将患有生殖道炎症的病鸡肛门处的溃疡物及被污染的羽毛清除掉,并用温盐水(1000 mL温水+2茶匙食盐)或0.1%高锰酸钾溶液冲洗泄殖腔和输卵管下部。可以用带有长橡皮嘴的注射器插入肛门内进行灌注。再用金霉素、四环素或链霉素等抗菌药物涂敷伤口。重症病例应立即淘汰。一般患有输卵管的病愈母鸡不宜留作种用。

3.9 在人工授精过程中,必须严格按照操作规程进行无菌操作,以避免母鸡生殖道的损伤和感染,引起种母鸡生殖系统发生疾病而影响产蛋和受精。因此必须要注意以下两方面的关键环节:一是要做好平时对种公鸡的防疫与检疫工作,加强种公鸡的饲养管理,使种公鸡保持健康良好的种用状态;另一方面是工作人员一定要有无菌操作意识,对所有授精用具必须在使用前严格消毒,输精后要及时清洗,并注意避免输精器具间的交叉感染。

此外,由人工授精而传播的疾病还包括:鸡的大肠杆菌病、支原体病、衣原体病、鸡病毒性关节炎。禽流感也可通过人工授精而传播。所以,若种公鸡患有上述疾病或其他传染病,就会通过人工授精传染给母鸡,使母鸡受感染传播。

鹅血液基因组 DNA 的简单快速提取方法研究

吴慧英¹, 刘 铀², 贾汝敏^{1*}, 刘艳芬¹, 张 丽¹

(1. 广东海洋大学动物科学系, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学动物医学系, 广东 湛江 524088)

摘要: 本研究针对家禽血液红细胞有细胞核的特点, 研究适合鹅血液基因组 DNA 的廉价、简便、快速的 DNA 提取方法, 并为其它禽(鸟)类相关操作提供参考。通过裂解细胞, 利用简便快速的操作方法将蛋白质和核酸分离, 去除杂质, 沉淀核酸, 获得大量基因组 DNA, 并通过基因扩增检测其质量和效果。该方法提取的基因组 DNA 电泳检测条带明显, 无拖尾, 含量及纯度均较高, 能够用于分子生物学实验研究。与传统的酚-氯仿 DNA 抽提方法相比, 本实验建立的血液基因组 DNA 提取方法具有成本低、操作步骤简便和快速的特点, 特别是对大量样品的提取更为实用。

关键词: DNA 提取方法; 鹅血液

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0029-03

Simple and rapid extraction method of goose blood genome DNA

Wu HuiYing¹, Liu You², Jia Rumin^{1*}, Liu Yanfen¹, Zhang Li¹

(1. Department of Animal Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Simple and rapid DNA extraction method was established according to the feature that the avian red blood cells have nucleolus, which would provide references for other fowls (birds). Blood cells were lysed and then the nucleic acid was separated from proteins. Then the genome DNA was acquired after precipitation. The quality of obtained DNA was detected by PCR and electrophoresis. The obtained genome DNA was complete and highly pure. Thus it could be used as the template for further analysis. The results showed that this DNA extraction method was simple, fast and with low cost. It was especially adapt to the extraction of large-scale samples.

Key words: DNA extraction method; goose blood

获得高纯度和完整的基因组 DNA 是进行后续分子生物学研究的基础, 而寻找合适的 DNA 提取方法是基因工程和分子生物学实验面临的首要问题。不同物种、不同材料其 DNA 提取方法各异^[1]。动物多采用活体采血继而从血液中提取 DNA, 这样可以在不杀死动物的前提下对其基因组 DNA 进行研究。从哺乳动物血液中提取基因组 DNA 的方法大都是先得到淋巴细胞, 再用蛋白酶 K 等消化。由于家禽及鸟类血液红细胞中有细胞核, DNA 含量丰富, 因此应建立适合家禽血液生理的 DNA 提取方法。目前, 以鸡为材料的家禽基因组 DNA 的提取方法较为常见, 如 CTAB 法、SDS 法、异硫氰酸

胍、热硼酸盐法以及商业 DNA 提取试剂盒等, 但鲜见鹅血 DNA 提取方面的报道; 且有些方法较为繁琐和昂贵。

我国是世界上养鹅数量最多且品种资源最为丰富的国家。狮头鹅、合浦鹅作为我国优良的地方家禽品种资源, 以其品质优良著称于世, 丰富了世界家禽遗传资源基因库, 尤其是狮头鹅作为我国乃至亚洲唯一的大型鹅种, 具有体型大、适应性强、产肉性能好、生长速度快、耐粗饲等优良特性, 是极为宝贵的家禽资源^[2], 但两鹅种都存在就巢性强及产蛋率低等缺点, 亟待从分子水平对其生物学特性进行研究。

收稿日期: 2010-03-30

*: 通讯作者

基金项目: 湛江市科技招标项目(0609135)、广东海洋大学基金项目(C04095)和校企合作项目(0810314)

但现有 DNA 提取方法对鹅血液基因组 DNA 的提取不能取得较好效果。因此,笔者在借鉴和改进前人工作的基础上^[3-9],研究建立一种适合鹅血液 DNA 提取的快速、简便、经济实用方法,以利于从分子水平上对鹅种生物特性进行研究,同时也为其它禽类分子遗传学的相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 试剂及样品 DNA 提取液:0.1M Tris-HCl (pH8.0),0.5M NaCl,0.05 M EDTA-Na₂,2% SDS,0.1%β-巯基乙醇,0.5%PVP(聚乙烯吡咯烷酮);抗凝剂 ACD^[15];氯仿-异戊醇(24:1);琼脂糖(Sigma 公司);DNA Marker、Taq DNA 聚合酶、dNTP 均购自 TaKaRa 公司;其它试剂均为国产分析纯。

血液样品采集:狮头鹅、合浦鹅各 60 只,无菌翅静脉采血 0.5 mL/只,加入抗凝剂 ACD,冻存于 -20℃ 备用。

1.2 DNA 提取方法 (1)取 20 μL 抗凝全血放入 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL DNA 提取液,充分混匀,65℃ 温水浴 30 min,期间振荡数次。(2)以 12 000 r/m 离心 10 min,小心取出上清转移至新的 1.5 mL 离心管,在上清中加入 1/10 体积的 3M NaAc (pH 5.2),4℃ 静置 20 min,再加入 300 μL 氯仿-异戊醇(24:1),剧烈振荡,4℃ 静置 20 min,12 000 r/m 离心 10 min。(3)转移上清至新的 1.5mL 离心管,加入等体积的异丙醇(-20℃ 预冷),轻轻颠倒混匀,室温放置 30 min;12 000 r/m 离心 5 min,弃去上清。(4)用 75%酒精洗涤沉淀两次,将离心管倒置于吸水纸上 5-10 min,待风干后加入 200 μL TE 溶解沉淀,-20℃ 低温保存备用。

1.3 基因组 DNA 的纯度、浓度测定 利用紫外分光光度计测定 DNA 溶液在 260 nm 和 280 nm 处吸光度值,根据 OD₂₆₀ nm 与 OD₂₈₀ nm 比值来估计 DNA 的纯度^[15],用 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值表示。根据公式计算 DNA 浓度:DNA 的含量 (mg/mL)=50×A₂₆₀×稀释倍数/1000

1.4 琼脂糖电泳检测 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,观察电泳条带大小及是否有拖尾现象。

1.5 PRL 内含子 2 引物扩增检测 根据 NCBI 发表的鹅 PRL 基因,利用 Primer5.0 设计 PRL 内含子两引物。PCR 引物序列如下:

上游引物:PRL1-CCTGAACAGGTTTGTGCTGG

下游引物:PRL2-CATGGATCTGCTGAGCTTGCT

PCR 反应体系:20 μL (DNA 模板 5 μL,10×PCR Buffer 2 μL,20 pmol/L 正反引物各 1 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,Taq 酶 1 μL,ddH₂O 8 μL)。

反应条件:94℃ 预变性 5 min,30 个循环(94℃ 变性 50 s,55℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 60 s),72℃ 再延伸 10 min。扩增完毕后用 1%琼脂糖电泳检测。

1.6 ISSR 多态性分析检测 以提取的 DNA 为模板进行 ISSR 标记多态性分析,PCR 产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,以检测所获得的 DNA 效果。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的纯度、浓度测定结果 若获得的 DNA 样品纯度低于 1.7,表明蛋白质被污染,可再次进行氯仿-异戊醇抽提除去蛋白质污染。本试验测得两个品种鹅 DNA 纯度 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值均在 1.78±0.16 左右,接近纯 DNA 比值 1.8。DNA 浓度为 1.32±0.37 mg/mL,可见 20 μL 血样即可获得较高浓度。

2.2 琼脂糖电泳检测结果 琼脂糖电泳检测 DNA 带型整齐、集中、无拖尾现象(见图 1),说明该方法所提取的基因组 DNA 完整、无降解。由图可见鹅血液基因组 DNA 分子量大于 15 000 bp。

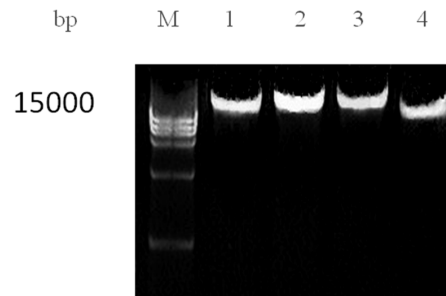


图 1 合浦鹅、狮头鹅血液样品提取基因组 DNA 结果

M:DNA Marker DL15,000;泳道 1、2 为合浦鹅血液提取 DNA 样品;泳道 3、4 为狮头鹅血液提取 DNA 样品

2.3 PCR 扩增结果 一种基因组提取方法的好坏,最有效的评定方法是看其产物是否会影响后续的研究。由图 2 可以看出,PRL 基因内含子 2 片段扩增结果整齐、清晰且无杂带,与预期片段相符。该方法所提取的基因组 DNA 可作为 PCR 扩增的模板,用于进一步序列分析。

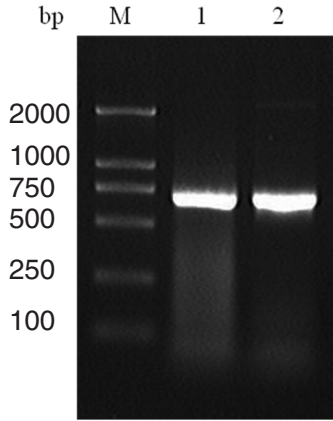


图2 合浦鹅、狮头鹅血液样品 DNA 经 PCR 扩增电泳结果

M: DNA Marker DL2000; 泳道 1、泳道 2 分别为合浦鹅、狮头鹅血液样品提取 DNA 经 PCR 扩增后 PRL 基因内含子 2 条带

2.4 ISSR 标记多态性分析 以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果各样品均能获得清晰稳定的条带 (图 3、图 4), 且多态性丰富, 说明鹅个体之间存在遗传差异, 研究价值较大。该方法提取的鹅基因组 DNA 能够满足 PCR 反应和后续分析的需要。

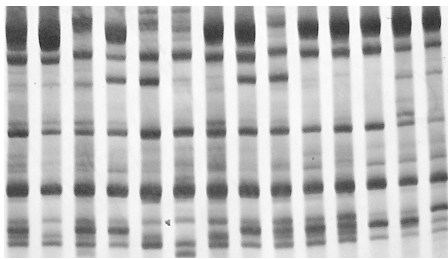


图3 合浦鹅 DNA 样品 ISSR 多态性分析电泳图

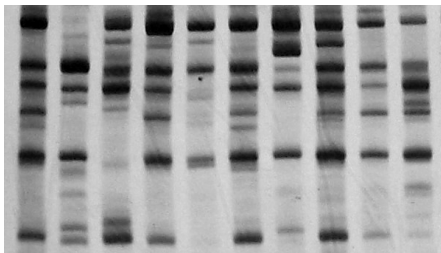


图4 狮头鹅 DNA 样品 PCR 扩增后 ISSR 分析电泳图

3 讨论

提取某样品核酸之前, 首先要清楚地了解该样品特性, 包括其核酸含量、酶含量、特殊杂质含量等信息。哺乳类动物的红细胞是中心部凹陷的圆板状, 循环血中的红细胞 (除骆驼和羊驼之外) 细胞核退化、消失; 而家禽红细胞多数呈椭圆形, 是完整的真核细胞, 中心有细胞核。所以用全血即可直接提取基因组 DNA, 且所需血样量不宜过多,

否则会影响所提 DNA 样品的质量。另外, DNA 的提取量还取决于细胞的裂解程度, 本方法采用提取液破碎细胞, 使基因组 DNA 充分释放, 有效地提高 DNA 获得量。

本方法最大的特点就是不用蛋白酶 K 消化蛋白, 而是用 DNA 提取液的盐成分裂解细胞, 用 SDS、氯仿-异戊醇等蛋白质变性剂有效的去除蛋白。盐 (如 Tris、EDTA、NaCl 等) 的作用, 除了提供一个合适的裂解环境外, 还可抑制样品中的核酸酶在裂解过程中对核酸的破坏, 维持核酸结构的稳定。应用此方法提取的鹅血液基因组 DNA, 经 PCR 扩增检测, 均获得了目的条带, 节约了大量成本。

笔者在进行氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提之前增加了一次离心去沉淀的步骤, 同时用低浓度的 NaAc 沉淀 DNA, 以促进 DNA 与多糖和其它次生代谢产物的分离, 从而使最后获得的 DNA 纯净度较高。

应用此方法提取的鹅血液基因组 DNA, 能够用于分子生物学实验研究、分子克隆、遗传多态性分析等, 而且整个过程快速、简单, 费用低廉, 方便了常规实验室操作, 特别是血液样本数量较大时更为实用。该方法也可以为其它禽 (鸟) 类的血液基因组 DNA 的提取提供参考。

参考文献:

- [1] 刘文, 柯辉鹏, 梁红. 动植物总核酸提取试验[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2008, 21 (3): 17-21.
- [2] 栾德琴, 杨海明. 地方禽类遗传资源的现状及保护[J]. 家禽科学, 2006, 7 (1): 3-5.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 第三版. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. 461-469.
- [4] 张细权, 吕雪梅, 杨玉华, 等. 用微卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异[J]. 遗传学报, 1998, 25 (2): 112-119.
- [5] 童大跃, 伍新尧, 陆惠玲, 等. DNA 提取方法的比较及改良[J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2003, 24 (4): 411-412.
- [6] Cao H, Paul P H, Shaw P C. Methodological Studies on Genomic DNA Extraction and Purification from Plant Drug Materials[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 1999, 7 (3): 130.
- [7] 柯柳玉, 谢燕燕, 肖天放, 等. 禽类全血 DNA 不同提取方法的比较[J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30 (2): 4-6.
- [8] Gustincich S G, Manfioletti G, Delsal D, et al. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood[J]. Bio Techniques, 1991, 11 (2): 298.
- [9] 汪永庆, 王新国, 徐来祥, 等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进[J]. 动物学杂志, 2001, 36 (1): 27-29.

百迪康消毒剂对副猪嗜血杆菌的杀灭试验

冷淑珍¹, 黄元², 梁瑞玲¹, 李惠华¹, 郑庆禄^{1*}

(1. 广州迈高化学有限公司, 广东 广州 510655; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 为了解一种主要成分为戊二醛、癸甲溴铵溶液的消毒剂百迪康对副猪嗜血杆菌 3 个血清型菌株的杀灭效果, 采用悬液定量杀灭试验、能量试验等方法进行试验。结果显示: 将该消毒剂稀释到 1:1 000 后, 作用 10min, 对副猪嗜血杆菌的杀灭率可达到 100%; 在稀释 1 500 倍和 2 000 倍时, 杀菌率效果良好, 仅作用 2min, 杀菌率均可达到 98% 以上。表明百迪康对副猪嗜血杆菌均有较好的杀灭效果。

关键词: 百迪康; 副猪嗜血杆菌; 杀灭试验

中图分类号: S852.61*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0032-02

我国规模化猪场的发病呈混合感染的特点, 通常是一种病原元凶降低病猪免疫力, 之后其他病原乘虚而入, 造成严重的继发感染。副猪嗜血杆菌病在全国范围内广泛分布, 给我国猪群带来很大威胁, 尤其是最近蓝耳病、圆环病毒病的流行, 增加副猪嗜血杆菌病爆发的几率给我国养猪业带来的损失更加严重^[1]。因此, 选择适当的、性能优良的消毒剂, 严格遵守不同环境的消毒制度, 对受威胁家畜和环境进行消毒至关重要。正确选择和使用消毒剂, 是广大养殖户关注的热点问题^[2]。

广东地区流行的副猪嗜血杆菌血清型主要有 4、5、13、12 和 14 型这 5 种, 以前三种最为常见。本次试验就广州某公司生产的百迪康消毒剂对 5、12 和 14 型副猪嗜血杆菌菌株的杀灭效果进行实验室检测, 以便指导临床用药。

1 材料

1.1 药品与试剂 消毒剂: 百迪康消毒剂 (批号: 20100106) 1:1000、1:1500、1:2000, 用灭菌标准硬水配制。中和剂: 3%(g/mL) 牛血清白蛋白 (3% BSA) 溶液, 0.22 μm 过滤备用。培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD 或 V 因子) 和新生小牛血清。

1.2 菌株 副猪嗜血杆菌 5 型、副猪嗜血杆菌 12 型和副猪嗜血杆菌 14 型各一株 (菌株来源: 广东省农业科学院兽医研究所)。

2 方法

2.1 中和剂鉴定试验^[3] 副猪嗜血杆菌为试验菌, 加入等量 3%(g/mL) 的牛血清白蛋白 (3% BSA) 制成含有机干扰物质的菌悬液用于试验。试验分 6 组: 消毒剂 + 菌悬液; 消毒剂 + 菌悬液 + 中和剂; 中和

剂 + 菌悬液; 消毒剂 + 中和剂 + 菌悬液; 胰蛋白胨生理盐水溶液 (TPS) + 菌悬液; TPS + 中和剂 + 培养基。试验结果, 当第 6 组不长菌, 第 3、4、5 组生长菌量在 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL 之间且 3 组组间菌数误差率不超过 15%, 第 2 组生长菌数超过 5 cfu/平皿, 第 1 组不长菌或菌数远少于第 2 组时, 表明所用中和剂及其使用浓度适宜。

2.2 定量杀菌试验 取 1.0 mL 菌悬液, 加入 9.0 mL 消毒液中。分别作用 2、3、5、10 min 后, 取出 1.0 mL 试液, 加进 9.0 mL 中和剂溶液中。中和 10 min 后, 取混合液 0.1 mL 作琼脂平板涂抹接种。每个稀释度接种 2 个平板。置 37°C 温箱培养 24 h 后, 计数菌落, 并计算其杀菌率^[4]。其中, 阳性对照组用无菌生理盐水代替消毒剂。

2.3 能量试验 取 6.0 mL 从副猪嗜血杆菌的 24 h 肉汤培养物, 加入 4.0 mL 50 mg/L 的酵母粉溶液中, 混匀配制成菌悬液用于试验。选择 3 个浓度的消毒剂, 各取 3.0 mL 分装于无菌试管内, 将菌悬液分 3 次 (间隔 10 min, 每次加 1.0 mL) 分别加入装有不同浓度消毒剂 (1:1 000、1:1 500、1:2 000) 的试管内。每次加菌后经 8 min 作用, 取菌药混合液 0.02 mL, 分别加至 5 支盛有 5 mL 含中和剂的肉汤管中, 在 37°C 温箱培养 48 h 后, 观察定性结果^[5]。消毒剂溶液有效浓度的判定标准为: 在前 2 次加菌后, 5 支肉汤管中有 2 支以上不长菌为合格, 其中若有 1 次长菌管超过 2 支为不合格。试验重复 3 次。

3 结果

3.1 中和剂试验结果 结果表明, 用 5 g/L 硫代硫酸钠, 2 g/L 卵磷脂, 与 10 g/L 吐温-80 的 TPS 组成的中和剂符合所定要求。由表 1 可见, 第 1 组消毒

剂对副猪嗜血杆菌的3个血清型菌株有杀灭作用;第3组和第5组菌落数对比显示中和剂对细菌的生长并无不良影响;第4组先加入消毒剂和中和剂,之后加入菌悬液,菌落并没有减少,说明该中和剂已经几乎完全中和了消毒剂的杀菌作用,因此符合要求。

3.2 定量杀菌试验结果 表2-表4显示:按照不同倍数稀释的消毒剂,作用2 min后,对不同血清型副猪嗜血杆菌的杀灭率可以达到96.35%以上,

且对5型副猪嗜血杆菌的杀灭作最强;随着时间的延长,稀释倍数为1:1 000,作用时间为10 min时,对这三个血清型副猪嗜血杆菌的杀灭作用可达到100%,这足以满足消毒剂的实际操作要求。

不同浓度消毒剂对5型副猪嗜血杆菌作用不同时间的杀灭率如表2;对12型副猪嗜血杆菌作用不同时间的杀灭率如表3;对14型副猪嗜血杆菌作用不同时间的杀灭率如表4。

表1 中和剂试验结果

| 分组 | 平均菌落数 (cfu/ mL) | | |
|-----------------------|-----------------|-----------|-----------|
| | 5型副猪嗜血杆菌 | 12型副猪嗜血杆菌 | 14型副猪嗜血杆菌 |
| 1、消毒剂+菌悬液 | 50 | 35 | 17 |
| 2、(消毒剂+菌悬液)+中和剂 | 21 000 | 15 200 | 3 100 |
| 3、中和剂+菌悬液 | 4 790 000 | 4 010 000 | 571 000 |
| 4、(消毒剂+中和剂)+菌悬液 | 4 770 000 | 3 975 000 | 573 000 |
| 5、胰蛋白胍生理盐水溶液(TPS)+菌悬液 | 4 890 000 | 3 960 000 | 578 000 |
| 6、TPS+中和剂 | 0 | 0 | 0 |

以上实验结果均为3次平均数。

表2 不同浓度消毒剂对5型副猪嗜血杆菌的杀灭率

单位:%

| 消毒剂 稀释度 | 对照组平均菌 落数(cfu/mL) | 2 min | 3 min | 5 min | 10 min |
|------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| 1:1000 | 4 890 000 | 99.42 | 99.51 | 99.91 | 100 |
| 1:1500 | 4 770 000 | 99.52 | 99.56 | 99.78 | 100 |
| 1:2000 | 4 690 000 | 99.13 | 99.22 | 99.37 | 99.78 |

表3 不同浓度消毒剂对12型副猪嗜血杆菌的杀灭率

单位:%

| 消毒剂 稀释度 | 对照组平均菌 落数(cfu/mL) | 2 min | 3 min | 5 min | 10 min |
|------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| 1:1000 | 4 210 000 | 99.21 | 99.35 | 99.72 | 100 |
| 1:1500 | 3 990 000 | 98.67 | 99.00 | 99.45 | 100 |
| 1:2000 | 4 030 000 | 96.50 | 97.04 | 99.37 | 99.50 |

表4 不同浓度消毒剂对14型副猪嗜血杆菌的杀灭率

单位:%

| 消毒剂 稀释度 | 对照组平均菌 落数(cfu/mL) | 2 min | 3 min | 5 min | 10 min |
|------------|----------------------|-------|-------|-------|--------|
| 1:1000 | 575 000 | 96.80 | 98.76 | 99.76 | 100 |
| 1:1500 | 581 000 | 96.77 | 97.02 | 98.34 | 99.42 |
| 1:2000 | 577 000 | 96.35 | 96.46 | 98.12 | 98.65 |

3.3 能量试验结果 表5-表7显示:前两次加菌后,加入1:1 000、1:1 500、1:2 000稀释的消毒剂的试管都未见长菌,可判断上述稀释倍数为该消毒剂的有效浓度。5型副猪嗜血杆菌能量试验结果见表5。12型副猪嗜血杆菌能量试验结果见表6。14型副猪嗜血杆菌能量试验结果见表7。

4 小结

试验结果表明,百迪康对副猪嗜血杆菌有很好的杀灭效果。按照1:1 000稀释后,作用2 min,对

表5 5型副猪嗜血杆菌能量试验结果(肉汤培养物长菌数)

| 加菌次数 | 1:1000 | 1:1500 | 1:2000 |
|------|--------|--------|--------|
| 1 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 3 | 0/5 | 0/5 | 1/5 |

表6 12型副猪嗜血杆菌能量试验结果(肉汤培养物长菌数)

| 加菌次数 | 1:1000 | 1:1500 | 1:2000 |
|------|--------|--------|--------|
| 1 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 3 | 1/5 | 1/5 | 1/5 |

表7 14型副猪嗜血杆菌能量试验结果(肉汤培养物长菌数)

| 加菌次数 | 1:1000 | 1:1500 | 1:2000 |
|------|--------|--------|--------|
| 1 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 2 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| 3 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |

5、12和14型副猪嗜血杆菌的杀灭率可达到96.80%以上;作用10 min,杀灭率可达到100.0%。在稀释1 500和2 000倍时,也显示良好的杀菌效果,能满足猪场消毒要求。

参考文献:

- [1] 周绪斌,周克钢,雷建良,等.副猪嗜血杆菌病研究与控制进展[C].全球猪业论坛暨2009中国猪业发展大会论文.
- [2] 刘子鑫.消毒及消毒剂简介[J].中国兽医杂志,2004,(7):37-38.
- [3] 卫生部卫生法制与监督司.消毒技术规范[S].北京:中华人民共和国卫生部,2002:20.
- [4] 王太星,蒋莉.三种方法检测消毒剂杀菌效果的结果比较[J].中国消毒学杂志,2002,19(3):162-166.
- [5] 刘南,李排兵,李秀安,等.二氯异氰尿酸钠消毒剂杀菌效果的实验观察[J].现代预防医学,2005,32(7):794-796.

应用多重套式 PCR 检测鸡毒支原体和鸡滑液囊支原体

黎敏, 管凤霞, 刘玲, 黄鹏华, 温纳相
(广东温氏食品集团有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要: 根据已发表的鸡毒和鸡滑液支原体血凝素基因序列 pMGA 和 v1hA 各设计两对引物, 建立鉴别诊断两种支原体的多重套式 PCR 方法, 对其进行温度条件、II 步模板浓度优化及特异性、敏感性实验。该方法在两步 PCR 后能特异地扩增出 MG (408 bp) 和 MS (688 bp) 两个目的片段。应用于临床样品检测, 与支原体分离、SPA 检测比较结果 PCR 灵敏度高于病原分离。

关键词: 鸡毒支原体; 鸡滑液支原体; 多重套式 PCR

中图分类号: S852.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0034-03

Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* using duplex PCR method

LI Min, GUAN Feng-xia, LIU Ling, HUANG Peng-hua, WEN Na-xiang
(Guangdong Wen's Foodstuffs Group Co., LTD., Yunfu 527400, China)

Abstract: On the basis of the hemagglutinin genes of pMGA from *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and v1hA9 from *Mycoplasma synoviae* (MS), a duplex PCR assay was developed and the reaction conditions including the reaction temperature, template concentration, specificity and sensitivity were optimized. The size of the PCR products was 408bp for MG and 688bp for MS. Three methods including duplex PCR, mycoplasma isolation and SPA were used to detect the samples from field. The results showed that the duplex PCR method was more sensitive than the methods of *Mycoplasma* isolation and SPA.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; duplex PCR

鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 和鸡滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*, MS) 通常被认为是致病性鸡支原体中最主要的两种。MG 可引起鸡的呼吸道疾病和产蛋率下降, 是支原体中对养禽业造成最严重经济损失者; MS 可引起鸡、火鸡和其它禽类的关节炎, 并与呼吸道疾病有所关联^[1], 临床上常出现两者同时混合感染的情况。诊断两者通常采用血清学方法, 但无论是 SPA、HI 还是 ELISA 都存在假阳性反应^[2], 仍需进行病原的分离鉴定进行确认, 费时费力, 不适应快速、准确的确诊要求。针对此情况分子生物学方法被广泛应用, 早期建立 PCR 诊断方法主要是针对 16S rRNA 基因设计, 但由于相似性高达 78%, 扩增后还需限制酶切分析^[3]或 DNA 探针^[4]验证, 因此近几年针对 MG *mgc2* 基因^[5]或是 MS *v1hA* 基因^[6]建立的 PCR 方法呈现新的发展趋向, 同时套式 PCR 较普通 PCR 灵敏度更高、特异性更好的优势使其在支原体研究中也广

泛应用^[7]。本试验针对血凝素基因 MS *v1hA* 基因和 MG pMGA 基因片段建立多重套式 PCR, 以期鉴别两种鸡支原体提供更为准确、快捷的诊断方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 种毒 MSGX11-T 株 (批号: 200407)、MG-BG447 株 (批号: 20050201)、法氏囊病毒 IBDC6/85 株 (批号: 20051019) 购自中国兽药监察所, 鸡喉气管炎病毒 (ILT) 、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 、鸡传染性贫血病毒 CAV 为广东温氏集团研究院禽病研究中心自行分离鉴定毒株。

1.1.2 实验仪器及试剂 MS 阳性血清 (批号: 200701)、MG 阳性血清 (批号: 200801) 购自中国兽药监察所; 禽流感病毒 AI H5 (批号: 20081028)、新城疫病毒 ND (批号: 20081118) 血凝抗原购自广东大华农动物保健品股份有限公司; DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; Ex-Taq 酶

购于大连宝生物工程公司,PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成;支原体液体培养基购于北京中海生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 支原体的培养和 DNA 提取

将两种支原体分别接种于液体培养基中,37℃培养至颜色变黄时

| 病原 | 上引物 P ₁ | 下引物 P ₂ |
|-------|---------------------------|-------------------------|
| MG I | GTGAAGAAAAAACATATTAAGTTT | CTAAGATGGATTGAAACATTAGT |
| MG II | AATGATGCGACTAAACCAA | TCCACCCACATACCCAA |
| MS I | AAACTACAAAACCTTTGTAATGGCT | TTACAAGTACGGTGTTAATCAAT |
| MS II | CGGTGATAACCCACAGA | ACCCCTCCTTAATACGCT |

1.2.3 多重 PCR 各反应退火温度的优化及反应条件确定

以 MG 及 MS 标准株 DNA 为模板,对所用的反应温度、反应时间、循环次数及 PCR 反应 II 加入模板浓度进行优化,确定最佳反应条件。

| 病名 | 选取基因片段 | 目的片段 (bp) |
|-------|--------|-----------|
| MG I | pMGA | 1900 |
| MG II | | 408 |
| MS I | v1hA | 1200 |
| MS II | | 688 |

1.2.4 多重 PCR 特异性测定

用建立的多重套式 PCR 方法对 ILTV、IBV、AIV、NDV、CAV、IBDV 进行检测以验证引物的特异性。

1.2.5 多重 PCR 灵敏度测定

将 MG 和 MS DNA 模板测定含量后 10 倍连续稀释成不同浓度,作为模板进行多重 PCR 反应,以验证灵敏度。

1.2.6 疑似临床样品的检测及确诊

1.2.6.1 多重 PCR 检测

收集来源于广东不同地区 3 个养禽场有呼吸道症状鸡的气管与支气管交接处组织、肺组织 3 份,放入培养液中培养 24 h 后提取 DNA,在优化的 PCR 反应条件下进行检测。

1.2.6.2 病原分离及平板凝集检测

将以上 3 个场的鸡病料样品剪成芝麻粒大小,培养液 37℃培养 3 代后,离心浓缩进行平板凝集检测。

2 结果

2.1 PCR 各反应退火温度的优化及反应条件确定

根据优化结果,采用 25 μL 反应体系:Premix Taq 酶 12.5 μL,DEPC 水 6.5 μL,MG、MS 上下游引物 10pmol 各 1.0 μL,模板 2.0 μL。反应 I 反应程

收集菌液,于 4℃以 12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体沉淀物,用 PBS 重复洗涤 3 次,取沉淀物溶于适量 TE,分别用基因组抽提试剂盒提取 DNA。

1.2.2 PCR 引物与 PCR 反应体系

根据 GenBank 上公布的 MG、MS 序列,设计合成下列引物:扩增片段大小为:

序为 94℃ 5min,94℃ 1min30s,53℃ 2min,72℃ 1min30s 30 个循环,72℃延伸 10min。将反应 I 产物做 100 倍稀释后作为模板进行反应 II,程序为 94℃ 5min,94℃ 1min,53℃ 50s,72℃ 1min 30 个循环,72℃延伸 10min。将所得产物通过琼脂糖电泳进行分析,能检测约 400 bp 和 680 bp 扩增条带(图 1)。

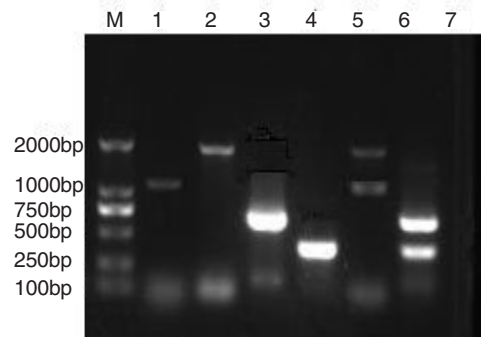


图 1 MG MS 扩增结果

M: marker; 1: MG PCR I; 2: MS PCR I; 3: MG PCR II; 4: MS PCR II; 5: MG+MS PCR I; 6: MG+MS PCR II; 7: 阴性对照

2.2 PCR 特异性分析

见图 2,能从 MG、MS 阳性模板中特异性扩增出目标条带,而对其他病毒模板呈阴性反应。

2.3 PCR 灵敏度试验

25 μL 反应体系中加入特定量的 MG 和 MS 模板,结果显示 MS 最低能检测到 10 fg, MG 最低 1 pg 的 DNA 样品(图 3)。

2.4 疑似临床样品的 PCR 检测

利用优化的 PCR 检测体系检测了 3 个不同来源病鸡的感染情况,以标准株为阳性对照。结果表明,其中 2 份样品能扩增出 688 bp 的基因片段(图 4)。

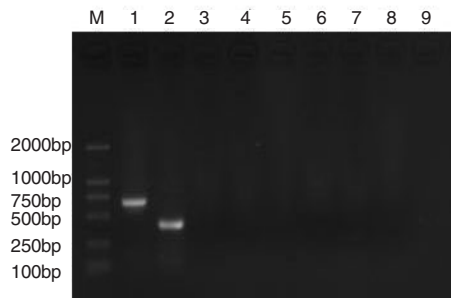


图2 特异性实验结果

M: marker; 1: MS; 2: MG; 3: ILTV; 4: IBV; 5: AIV; 6: NDV; 7: CAV; 8: IBDV; 9: 阴性对照

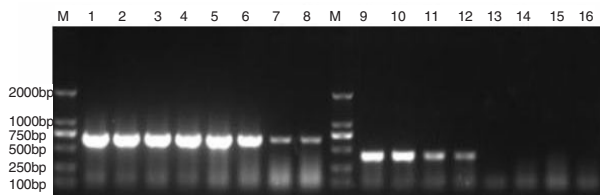


图3 PCR 灵敏度试验结果

M: marker; 1-8: MS100ng、10ng、1ng、100pg、10pg、1pg、100fg、10fg; 9-16: MG1ng、100pg、10pg、1pg、100fg、10fg、1fg、0.1fg、0.01fg

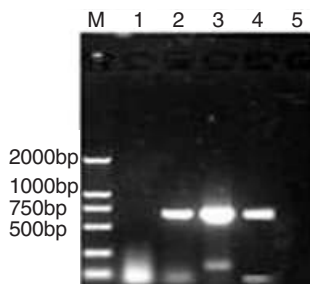


图4 PCR 检测疑似支原体临床样品

M: marker; 1: 样品 1; 2: 样品 2; 3: 样品 3; 4: MS 阳性对照; 5: 阴性对照

2.5 病原分离及 SPA 检测 对采集样品进行病原分离培养,置 37℃温箱培养,待培养液变为橙色或黄色时,接种到新的培养液中传代,3 代后离心收集沉淀做平板凝集试验,结果与 PCR 检测结果相符,2 个样品与 MS 标准阳性血清呈凝集反应。

3 小结与讨论

与其他 PCR 相比,nPCR 法具有灵敏、特异等优点,大大提高工作效率和检测效率。pMGA 基因是 MG 基因组中 1 个大的基因家族,决定其宿主特异性和组织嗜性^[8],MS 的血凝素 Vh1A 是一种主要的脂蛋白基因^[9]。两者是近几年新型诊断方法和亚单位疫苗研究的热点基因,具有很强的特异性,因

此根据此基因设计的套式 PCR 方法比传统的扩增 16SrRNA 基因的 PCR 在灵敏度和特异性上有优势。

MS 和 MG 临床上常出现混合感染的情况,快速鉴别诊断是净化和尽快采取防控措施的前提。多重 PCR 技术一次反应可以同时检测多种病原,与常规 PCR 技术相比,简化了检测程序,特别是在目前禽病多呈临床症状不典型、多种疾病混合感染的情况下,采用多重 PCR 技术会大大提高鉴别诊断的速度,节约生物试剂和人力资源,是未来 PCR 检测技术发展的方向。

本研究对早期诊断 MG、MS,及时采取相应的防治措施,以及建立无 MG、MS 感染鸡群都有实际应用价值。

参考文献:

- [1] Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al. Disease of Poultry, 9th ed[M]. Iowa State University Press, 1991. 198-212.
- [2] Avakian A P, Kleven S H, Glisson J R. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test, and hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Avian Dis, 1988, 32:262-272.
- [3] Garcia M, Jackwood M W, Levisohn S, et al. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism[J]. Avian Dis, 1995, 39:606-616.
- [4] Garcia M, Jackwood M W, Head M, et al. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplification products[J]. J Vet Diagn Investig, 1996, (8):56-63.
- [5] Garcí a M, Ikuta N, Levisohn, et al. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens[J]. Avian Dis, 2005, 49:125-132.
- [6] Hong Y, Garcí a M, Leiting L, et al. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene v1hA[J]. Avian Dis, 2004, 48:606-616.
- [7] 李彦明, 张映. 套式 PCR 在支原体检测中的应用[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(3), 237-240.
- [8] Razin S, Jacobs E. *Mycoplasma* adhesion[J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(3):407-422.
- [9] Bencina D, DrobnicValic M, Horvat S. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 203:115-123.

猪繁殖与呼吸综合征病毒在 Marc-145 细胞微载体上培养条件的研究

穆光慧, 李嘉爱, 齐冬梅*

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 通过研究搅拌程序, 细胞接种密度, 微载体浓度与细胞生长的关系, 探索 Marc-145 细胞在微载体上的生长条件, 并测定猪繁殖与呼吸综合征病毒在微载体培养的细胞上的 TCID₅₀。结果表明: 细胞接种密度为 4.28×10^5 cells/mL 时, 病毒滴度可达到 $10^{7.5}$ TCID₅₀, 这说明利用微载体繁殖 PRRSV 是可行的, 为猪繁殖与呼吸综合征疫苗的大规模生产奠定实验基础。

关键词: Marc-145 细胞; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 微载体

中图分类号: S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0037-04

Culture of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on Marc-145 cell microcarriers

Mu Guanghui¹, Li Jiaai¹, Qi Dongmei^{*}

(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 511356, China)

Abstract: The growth condition of Marc-145 cell on the surface of microcarriers was investigated in this experiment by researching on the relationship between the agitation procedure, density of cells inoculated, microcarrier concentration and the growth of Marc-145 cell, and the TCID₅₀ titer of PRRSV was detected also. The result indicated that the viral titer could reach $10^{7.5}$ TCID₅₀ when the density of cells inoculated was 4.28×10^5 cells/ml. It was feasible to propagate the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on microcarriers, which laid the experimental foundation for mass production of PRRS vaccine.

Key words: Marc-145 cell; porcine reproductive and respiratory syndrome virus; microcarriers

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种严重危害养猪业的传染病^[1]。20世纪80年代,美国首先报道了一种在猪群中发生的新的灾难性疾病^[2]。1991年,荷兰中央兽医研究所确定该病的病原是一种新的RNA病毒,并命名为Lelystad病毒^[3,4]。1996年郭宝清^[5]等首次从疑似PRRS感染的猪群中分离到了PRRSV,证实本病已存在于我国。2006年4月^[6]我国猪群暴发了高致病性繁殖与呼吸综合征,给养猪业造成了巨大的经济损失。所以该病引起了国内外学者的高度关注,对其研究也不断深入。我国目前控制PRRS的主要方法是使用疫苗进行免疫预防,高滴度的病毒液是疫苗生产中非常重要的一个环节。

利用微载体培养 Marc-145 细胞繁殖 PRRSV 有许多优点,如提高生产能力,减少对培养基和劳

动力的需求,降低污染的风险等。本实验旨在摸索 PRRSV 在微载体 Cytodex-3 上的生长条件,为 PRRS 疫苗的大规模生产奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和培养基 Marc-145 细胞由广东永顺生物制药有限公司保存;培养基为 GIBCO 公司 Minimum Essential Medium。

1.1.2 毒株 PRRS GD-07-02 株,由广东永顺生物制药有限公司分离、鉴定、保存。

1.1.3 试剂和仪器 微载体 Cytodex-3(CT-3)为美国 GE 通用电气有限公司产品;Micro-Stir[®] 低速磁力搅拌器和 Celstir[®] 双侧臂细胞生物反应器(培养瓶)均为美国 wheaton 公司产品;二甲基二氯硅烷为 Sigma 公司产品;XDS-2 型倒置显微

收稿日期:2010-05-10

*:通讯作者

基金项目:广东省农业科技重大专项(2008A020100020)

镜为广州粤显光学仪器有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 玻璃器皿的硅化 备用的玻璃器皿先用自来水冲洗干净,烘干后再放入清洁液中浸泡 24 h,取出后用自来水冲净,再用双蒸水洗 3 次后置烘箱中干燥;将干燥后的玻璃器皿放入通风厨中,取少量的硅化液(二甲基二氯硅烷的氯仿溶液)加入到干净的玻璃器皿中,润湿所有可能接触到微载体的表面,将多余的硅化液从器皿中倒出,然后将其晾干。玻璃器皿用蒸馏水彻底地冲洗(至少 2 次)并高压蒸汽灭菌。

1.2.2 Cytodex-3 微载体预处理 (1)水合:将称量好的 1.2 g Cytodex-3 (CT-3)微载体(按终浓度为 3 mg/mL^[7]计算,培养体积为 400 mL)加至经硅化的锥形瓶中,用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS (pH7.2, 0.15 mol/L) 浸泡,混匀后,再加入几滴 Tween-80, 37℃温箱中水合 3 h。将上清弃去,再加入新鲜的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS (pH7.2, 0.15 mol/L), 50 rpm, 温和搅拌 10 min; 洗涤一次, 弃去洗涤的 PBS, 加入新鲜的无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS, 然后高压蒸汽灭菌, 116℃, 20 min^[8]。(2)平衡:将已高压蒸汽灭菌的 CT-3 取出, 倒掉 PBS, 并用新鲜的 PBS 洗涤一次, 再用无血清的 MEM 液洗涤两次, 待 CT-3 全部沉入瓶底后, 倒掉液体, 最后用无血清的 MEM 液浸泡, 37℃温箱中平衡过夜。

1.2.3 细胞培养搅拌程序 本实验搅拌程序采用循环与双速度搅拌混合模式。搅拌程序包含循环搅拌(起始搅拌程序)和恒速搅拌两个子程序——细胞接种后循环搅拌程序启动, 生物反应器以循环速度(Cycle speed)运行 2 min(Cycle time on), 然后暂停 40 min(Cycle time off), 经过 6 个循环数(Cycle count)即 3~4 h 之后, 恒速搅拌程序启动, 生物反应器以最终运行速度(Run speed)恒速搅拌下去。A、B、C 三组搅拌程序见表 1。

1.2.4 微载体细胞培养

1.2.4.1 接种细胞: 克氏瓶中细胞经 ET 消化后, 营养液悬浮细胞, 细胞计数后, 将细胞加入微载体中, 补加营养液至终体积的 1/3。微载体培养终体积为 400 mL, 将接种了细胞的 Celstir[®] 双侧臂细胞生物反应器放至 37℃温箱中的 Micro-Stir[®] 低速磁力搅拌器上。

1.2.4.2 细胞培养: A 组、B 组、C 组按所设程序分别搅拌 4 h, 3 h, 3 h 后, 将培养体积补至 400 mL, 进入连续搅拌阶段, 最终搅拌速度分别为 60

rpm, 55 rpm 和 55 rpm。

表 1 循环与双速度搅拌混合模式

| 搅拌程序 | A 组 | B 组 | C 组 |
|-------------|-----|-----|-----|
| 起始培养体积(mL) | 130 | 130 | 130 |
| 最终运行速度(rpm) | 60 | 55 | 55 |
| 循环运行时间(min) | 2 | 2 | 2 |
| 循环暂停时间(min) | 40 | 30 | 30 |
| 循环速度(rpm) | 50 | 45 | 45 |
| 循环数 | 6 | 6 | 6 |
| 运行时间(h) | 4 | 3 | 3 |
| pH | 7.0 | 7.0 | 7.0 |

1.2.5 病毒增殖与收获

1.2.5.1 病毒接种: 镜下观察, 细胞在微载体上已长成致密单层时, 弃去营养液, 将 10 mL 病毒液(PRRSV GD-07-02 株)加入微载体细胞悬液中, 混匀后, 室温吸附 20 min, 然后补加维持液至终体积为 400 mL, 37℃, 低速磁力搅拌器上连续搅拌, 速度为 60 rpm。

1.2.5.2 收毒: 镜下观察, 微载体上细胞出现病变, 圆缩并有脱落, 有些区域可见空球, 溶液中可见游离的细胞, 病变细胞达 70% 时收毒。收集上清, 并反复冻融三次。

1.2.6 TCID₅₀ 的测定 待 96 孔细胞板上细胞长成单层后, 弃去营养液, 加入维持液, 100 μL/孔, 对照孔 200 μL/孔。在深孔稀释板中加入维持液 900 μL/孔, 分别取 A、B、C 三组收集的病毒液 100 μL, 加入深孔稀释板第一排至第三排的第一孔中, 10 倍稀释为 10⁻¹~10⁻⁸, 取 10⁻⁴~10⁻⁸ 四个稀释度进行测定, 每个滴度做 6 个重复。然后于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养, 逐日观察, 记录细胞病变, 用 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

2 结果

2.1 微载体 Cytodex-3 预处理 预处理好的 CT-3 如图 1 所示, 外表光滑, 呈悬浮状态。

2.2 细胞接种密度测定 各组细胞接种密度分别为: A 组 -4.28×10^5 cells/mL; B 组 -1.70×10^5 cells/mL; C 组 -2.31×10^4 cells/mL; C 组补偿接种细胞密度 -1.72×10^5 cells/mL。

2.3 Marc-145 细胞在微载体 Cytodex-3 上的生长情况 接种 Marc-145 细胞 24 h 后, 显微镜下可见, A 组中微载体上已全部长满 Marc-145 细胞(图 2); B 组中部分微载体上已长满 Marc-145 细胞, 但仍有部分微载体上未长满或仅有几个细胞贴壁, 甚至出现空球(图 3); C 组中微载体上仅有个别细胞贴壁, 且空球较多(图 4), 但在补接种

细胞后 24 h, C 组中大部分微载体上已长满细胞, 但仍有部分微载体上细胞未长满(图 5)。

2.4 Marc-145 细胞在微载体 Cytodex-3 上增殖 PRRSV 在病毒增殖阶段, 接种 PRRSV 48 h 后, 显微镜下可以观察到细胞病变, 产生病变的细胞逐渐从微载体表面脱落下来(图 6), 开始有游离细胞出现(箭头所指); 随着培养时间的延长, 当接种病毒

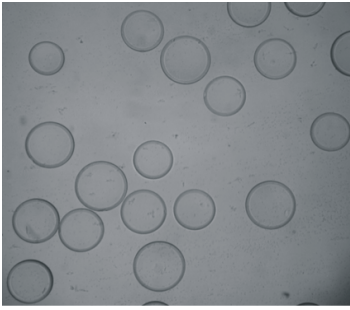


图 1 Cytodex-3 载体

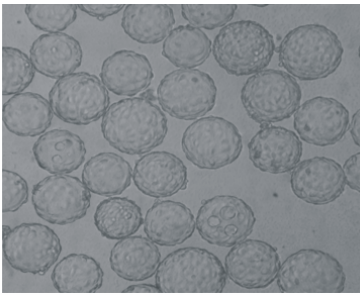


图 2 A 组接种后 24 小时 Marc-145 细胞的生长状态

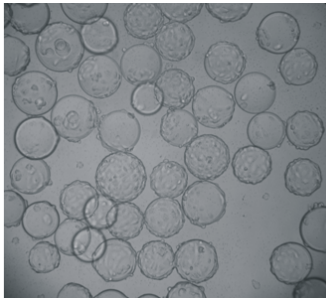


图 3 B 组接种后 24 小时 Marc-145 细胞的生长状态

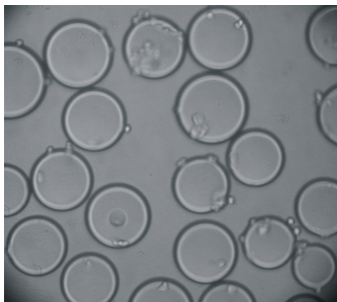


图 4 C 组接种后 24 小时 Marc-145 细胞的生长状态

57 h 后, 脱落细胞增多(图 7), 病毒维持液略显混浊; 71 h 后, 绝大多数细胞从微载体上脱落, 出现大量游离细胞, 同时可见部分微载体变成空球(图 8)。

2.5 TCID₅₀ 的测定 根据表 2、表 3 和表 4 统计数据, 按照 Reed-Muench^[9] 方法计算收获病毒液的 TCID₅₀。即: (高于 50% 的百分数) - 50 / (高于 50% 的百分数) - (低于 50% 的百分数), 所以 A 组、B 组、C 组病毒液滴度分别为 10^{-7.5}/mL、10^{-6.64}/mL、10^{-6.0}/mL。

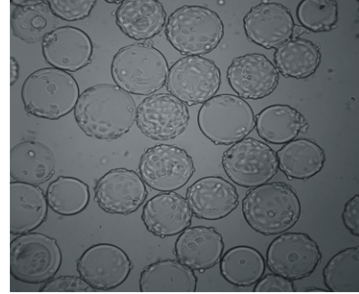


图 5 C 组补偿接种后 24 小时 Marc-145 细胞的生长状态

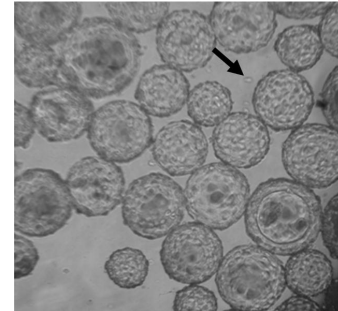


图 6 接种病毒 48 小时后, Marc-145 细胞的病变情况

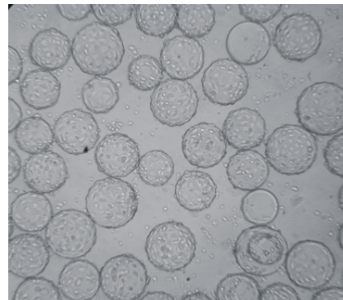


图 7 接种病毒 57 小时后, Marc-145 细胞的病变情况

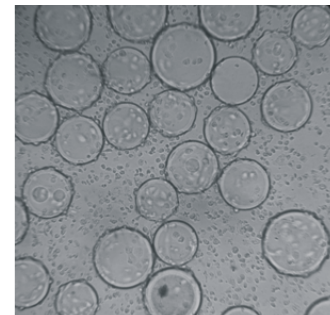


图 8 接种病毒 71 小时后, Marc-145 细胞的病变情况

表 2 A 组病毒液 TCID₅₀ 的测定

| 病毒液 稀释度 | 细胞孔观察结果 | | 累计细胞孔数 | | 细胞孔总数 | 出现 CPE 的 细胞孔所占的% |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|-------|---------------------|
| | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | | |
| 10 ⁻⁴ | 6 | 0 | 18 | 0 | 18 | 100 (18/18) |
| 10 ⁻⁵ | 6 | 0 | 12 | 0 | 12 | 100 (12/12) |
| 10 ⁻⁶ | 6 | 0 | 6 | 0 | 6 | 100 (6/6) |
| 10 ⁻⁷ | 0 | 6 | 0 | 6 | 6 | 0 (0/6) |
| 10 ⁻⁸ | 0 | 6 | 0 | 12 | 12 | 0 (0/12) |

表 3 B 组病毒液 TCID₅₀ 的测定

| 病毒液 稀释度 | 细胞孔观察结果 | | 累计细胞孔数 | | 细胞孔总数 | 出现 CPE 的 细胞孔所占的% |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|-------|---------------------|
| | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | | |
| 10 ⁻⁴ | 6 | 0 | 13 | 0 | 13 | 100 (13/13) |
| 10 ⁻⁵ | 5 | 1 | 7 | 1 | 8 | 87.5 (7/8) |
| 10 ⁻⁶ | 2 | 4 | 2 | 5 | 7 | 28.6 (2/7) |
| 10 ⁻⁷ | 0 | 6 | 0 | 11 | 11 | 0 (0/11) |
| 10 ⁻⁸ | 0 | 6 | 0 | 17 | 17 | 0 (0/18) |

表 4 C 组病毒液 TCID₅₀ 的测定

| 病毒液 稀释度 | 细胞孔观察结果 | | 累计细胞孔数 | | 细胞孔总数 | 出现 CPE 的 细胞孔所占的% |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|-------|---------------------|
| | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | 出现 CPE 孔 | 不出现 CPE 孔 | | |
| 10 ⁻⁴ | 6 | 0 | 9 | 0 | 9 | 100 (9/9) |
| 10 ⁻⁵ | 3 | 3 | 3 | 3 | 6 | 50 (3/6) |
| 10 ⁻⁶ | 0 | 6 | 0 | 9 | 9 | 0 (0/9) |
| 10 ⁻⁷ | 0 | 6 | 0 | 15 | 15 | 0 (0/15) |
| 10 ⁻⁸ | 0 | 6 | 0 | 21 | 21 | 0 (0/21) |

3 讨论

细胞的微载体技术是动物细胞培养中最先进的技术之一,为细胞的大量生产提供了可能,即可从小培养体积得到高产量的细胞。本实验在 3 mg/mL 微载体浓度条件下,研究 4.28×10^5 cells/mL, 1.70×10^5 cells/mL, 2.31×10^4 cells/mL 和 1.72×10^5 cells/mL 的细胞接种密度对细胞在微载体上生长的影响,结果表明在微载体浓度相同条件下,细胞接种密度不宜过低,否则细胞很难贴满微载体,导致空球率较高,最终会影响病毒液滴度。本研究利用生物反应器和微载体培养 Marc-145 细胞生产 PRRSV,表明该方法在 PRRS 疫苗的大规模生产中具有极大的应用价值和潜力。本实验中病毒液滴度最高可达到 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL,平时进行转瓶培养病毒时也可达到此滴度。原因在于此次采用的细胞生物反应器为半自动系统,pH 值、营养液及维持液的更换都需人工控制;若为全自动细胞生物反应器,则替换被细胞生长耗尽的基本营养,去除抑制细胞生长和存活的代谢产物和控制 pH 值都能被系统实时调控并及时补给,那么一定体积培养基的细胞产量能够达到最大;微载体浓度还可提高,这与细胞生长也是相关的。所以微载体培养病毒液的滴度还存在很大的提升空间。

参考文献:

- [1] Meulenberg J J. PRRSV, the virus[J]. Vet Res, 2000, 31 (1):11-21.
- [2] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology[J]. Am Assoc Swine Pract Newsletter, 1989, (1):1-10.
- [3] Terpstra C, Wensvoort G, Pol J M A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled[J]. Vet Q, 1991, (13):131-136.
- [4] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. Vet Q, 1991, (13):121-130.
- [5] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1996, 2(2):1-5.
- [6] Yan-Jun Zhou, Hai Yu, Zhi-Jun Tian, et al. Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008[J]. Virus Research, 2009, (144):136-144.
- [7] Marta Cristina O Souza, Marcos S Freire, Erica A Schulze, et al. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures [J]. Vaccine(2009), doi:10.1016/j.vaccine.2009-06-023.
- [8] Chia-Chyi Liu, Wei-Cheng Lian, Michael Butler, et al. High immunogenic enterovirus 71 strain and its production using serum-free microcarrier Vero cell culture[J]. Vaccine, 2007, (25):19-24.
- [9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 329-331.

犬骨盆骨折内固定术一例

廖丹桦, 陈义洲, 熊惠军*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S857.16

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0041-02

犬骨盆骨折是临床常见病例, 引起骨盆骨折的原因通常是车祸、坠楼等意外事故。在临床上骨盆骨折的治疗方法有接骨板及螺钉内固定^[1]和全环或半环钢丝内固定^[2]。本病例根据骨折具体情况, 采用接骨板结合金属丝内固定的方法整复髌骨骨折, 治疗效果良好。

1 病例情况和临床诊断

雪纳瑞犬, 雌性, 8月龄, 体重 6.5 kg。2008年 11月 24日晚从住所二楼阳台跌落至一楼草坪, 跌落后无法走动, 呈半侧卧姿势, 次日送至华南农业大学动物医院就诊。临床检查精神状态良好, 但无食欲, 体温 38.8℃, 心率、呼吸正常, 触诊其两后肢股部异常敏感, 动物反应剧烈, 有明显的疼痛感。主诉在该犬跌落后至就诊前只排尿一次, 且尿中带血。X线检查提示骨盆右侧荐髂关节前方脱位, 右侧髌骨体骨折(图 1、图 2)。

2 术前观察与治疗

术前先观察患犬身体的生理状况, 包括精神状况, 饮食状况及大、小便排泄情况。由于该犬在发病后出现血尿, 不排除内脏软组织出现损伤, 须观察后判断是否适合进行手术。就诊当天和次日均给予皮下注射止血敏 0.5 mL, 肌肉注射头孢拉定 0.25 g。该犬至第三天尿液表现正常, 但仍做保守观察, 直至第 6 d 进行骨盆骨折处手术内固定。

3 术前用药与保定

术部剃毛, 手术前肌肉注射阿托品 0.5 mL, 10 min 后静脉注射舒泰 0.3 mL, 静脉滴注 0.9%氯化钠注射液 100 mL, 氨苄西林 0.5 g, 维持手术过程。待动物进入麻醉状态后, 右侧卧保定, 术部常规消毒。手术过程中分别两次静脉追加舒泰各 0.2 mL, 分别 3 次肌肉注射追加犬眠宝各 0.4 mL, 0.2 mL, 0.1 mL。静脉滴注追加 0.9%氯化钠注射液 100 mL。

4 术式

从髌骨嵴中心位置开始向后延伸至大转子前

做一弧度稍向下的皮肤切口, 按皮肤切口切开皮下组织、臀部脂肪和浅筋膜, 用拉钩连同皮肤一起牵引拉开。沿皮肤切口线切开臀深筋膜, 可见臀中肌, 用止血钳钝性分离臀中肌与阔筋膜张肌之间的肌间隔, 剥离依附于髌骨上的臀中肌, 显露部分髌骨体, 分离过程中有一动脉出血, 立即先用纱布按压止血, 再用可吸收缝合线结扎止血。向后适当分离部分臀深肌, 逐步暴露骨折断端。钝性分离臀中肌与缝匠肌, 并分离部分髌肌使一手指能伸入髌骨翼腹侧触摸荐骨体, 可感觉整块髌骨翼因髌骨体中段骨折和荐髂关节的脱位而游离, 活动性明显增大。

结合骨折实际情况, 选用“T”形 4 孔接骨板结合金属丝固定髌骨体骨折处。在髌骨体骨折的两断端按照接骨板螺钉固定孔的位置, 用电钻钻出相应的孔径。先用两根金属丝分别穿过两骨折断端两对横向的孔, 用持骨钳钳夹两骨折断端, 牵拉对位。将“T”形接骨板按已钻孔的位置安放于髌骨体上并将骨板上的孔穿过已放置好的金属丝, 将两骨折断端两根金属丝的四个端交叉拧紧、固定。最后用一根金属丝将接骨板末端连带髌骨体环绕一周做一个全环结扎。

用一手指伸入髌骨翼腹侧触摸荐骨体, 另一手使往头侧移位的髌骨翼复位, 借助髋关节的牵引, 使荐髂关节复位, 用电钻从髌骨翼钻入孔径直达荐骨体, 用螺钉从髌骨翼肌面垂直拧入荐骨, 以作固定。清除创口内血凝块, 间断缝合被分离的肌肉组织, 连续缝合臀深筋膜, 常规缝合皮下组织和皮肤, 碘酊消毒皮肤创缘。

术后 X 线检查示髌骨体骨折断端对接良好, 荐髂关节基本复位(图 3、图 4)。

5 术后护理

术后伤口创缘每天擦拭碘酊一次并更换伤口纱布。术后连续 3 d 每天静脉滴注 0.9%氯化钠注射液 100 mL, 氨苄西林 0.5 g。伤口愈合良好, 术后 7 d



图 1 术前腹背位 X 线片

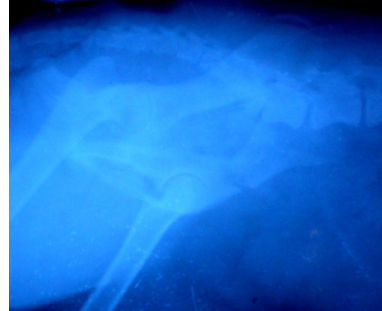


图 2 术前侧位 X 线片



图 3 术后腹背位 X 线片

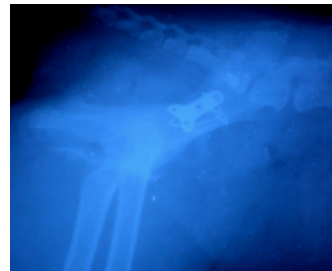


图 4 术后侧位 X 线片

拆线。术后两周内限制活动,一个月后开始慢慢训练患侧行走能力,术后三个月内防止其出现跳跃、奔跑等剧烈运动。术后正常喂食,适当补充钙及维生素 A、D。术后 40 d 回访,该犬康复较好,走、跑、坐、卧、站立等日常行动均正常。X 线检查示髂骨体骨折处愈合较好,已有新骨形成,荐髂关节处愈合仍较慢。术后 4 个月回访,该犬活动正常,X 线检查显示右侧髂骨体骨折处生长良好,荐髂关节处恢复良好。

6 讨论

6.1 该犬髂骨体骨皮质薄,骨髓腔小,加上髂骨体处的弯曲度,使用接骨板加螺钉难以将螺钉较牢地拧紧于髂骨体上,改用接骨板配合金属丝半环和全环结扎,既能使接骨板在骨折处起到固定作用,又能避免因螺钉无法拧紧而松脱的影响。

6.2 由于骨盆周围是软组织脏器,当弄清楚致伤原因,确诊骨盆骨折时,必须注意检查盆腔周围的脏器,可能在骨盆骨折的同时也引起体内某些脏器的损伤,如躯体遭受强烈撞击可能使储积有尿液的膀胱破裂^[1]。例如该病例在坠楼后至就诊前有自主排尿,且尿中带血,由于该犬一向排尿正常,所以不排除可能是由于坠楼引起的膀胱或尿道伤害。鉴于情况轻微,采取术前保守治疗。对于泌尿系统情况的了解,可以在问诊时询问主人,动物在事故发生之前短时间内是否有排尿。如果没有或主人无法确定,则要了解动物在事故发生之后是否有排尿。根据能否自主排尿及排出的尿液

性状来辅助判断泌尿系统的受损程度。

6.3 髂骨体骨折伴随同侧荐髂关节脱位的情况在骨盆骨折的病例中较为常见。此类骨折内固定手术选择的通路常用髂骨外侧切开手术通路并向前延伸结合荐骨腹侧手术通路^[3],以充分显露髂骨体和荐髂关节腹侧。在该手术通路中,有两处动、静脉需给予注意:①位于髂骨腹侧缘的髂腰动、静脉。该动静脉在分离臀中肌与缝匠肌时会遭到损伤,应先对血管进行结扎,防止大出血。该血管向下延伸至髂肌,当沿髂骨体腹侧分离髂肌时,该动脉可能会被切断,最好用烧烙或骨蜡止血^[3]。②臀前动、静脉和神经。当分离臀深肌与臀中肌时,只要小心牵拉,该动、静脉和神经一般可予以保护。

6.4 在骨折整复手术后,两周内限制患犬活动有助于骨折部位的尽早恢复,同时也可防止因剧烈运动而造成内固定物意外松脱。康复期间在日常饮食中适当添加钙制品及维生素 A、D,可促进骨质合成,加速骨愈合。

参考文献:

- [1] Theresa Welch Fossum. 小动物外科学[M]. 张海彬,译:北京:中国农业大学出版社,2009. 946.
- [2] 袁占奎,陈宏武,成安慰,等. 犬髂骨骨折内固定病例[J]. 中国兽医杂志,2007,43(5):47.
- [3] Donald L, Piermatte, Kenneth A, et al. 犬猫骨骼与关节手术入路图谱[M]. 侯加法,译:沈阳:辽宁科学技术出版社,2008. 223-227.

犬会阴疝的手术治疗

李开江, 毛新春

(华南农业大学动物医院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S857.12

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0043-03

会阴是体壁的一部分,覆盖于骨盆后口,环绕肛门与泌尿生殖道周围。盆腔由肛门提肌、尾骨肌、荐坐韧带、臀浅肌、闭孔内肌和肛门外括约肌等组成,供直肠和肛门通过。当会阴部肌肉组织发生各种病理缺陷造成腹腔脏器向会阴外突出甚至脱出至皮下时,即形成会阴疝。疝内容物通常为结缔组织、脂肪、前列腺、膀胱等等。本病发病原因比较复杂,有先天性、外伤、盆腔肌无力、前列腺肥大和激素分泌失调等原因。妊娠后期、难产、强烈努责、严重便秘以及脱肛等情况常诱发本病。

华南农业大学动物医院自2009年11月到2010年3月共收治9例犬会阴疝病例,全部为未去势公犬,均采用手术治疗,治疗效果确实。术后电话回访均未出现并发症,康复良好。现将手术治疗过程介绍如下。

1 临床表现和诊断

1.1 病例情况 见表1。9只发病犬中,全部为雄性且均未做去势手术,平均发病年龄为9.6岁,右侧发病的为6只(占2/3)。

1.2 临床症状 所有病例都出现会阴部不同程度的肿胀,肿胀部位一般位于肛门的外下侧方。双侧同时发病时可表现为肛门外突(图1、图2);有

些伴有前列腺疾病或是前列腺和膀胱发生扭转的病例可出现淋尿甚至尿闭症状;伴有直肠憩室的多数会出现大便蓄积,肿胀部位硬结;直肠检查可触摸到直肠憩室(单、双侧均可发生)、肿大的前列腺以及胀满的膀胱(图3)。临床表现为:排便困难,分数次不能排净;大便细长,里急后重,顽固性便秘,大便疼痛;其他症状还有会阴部患侧皮肤变红甚至发紫(图4)。

1.3 临床检查 X线摄片以及B超探查可以见到蓄积的粪便,肿大的前列腺,不同充盈程度的膀胱,结缔组织和脂肪等。排尿障碍的犬会出现氮血



图1 会阴疝,肿胀

表1 9只会阴疝病犬基本情况

| 品种 | 年龄(岁) | 性别 | 术前去势 | 发病侧 | 疝内容物 |
|-----|-------|----|------|-----|----------------|
| 京巴 | 8 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 直肠憩室,蓄便 |
| 京巴 | 12 | 雄 | 未去势 | 双侧 | 直肠憩室,蓄便,膀胱,前列腺 |
| 京巴 | 6 | 雄 | 未去势 | 双侧 | 直肠憩室,蓄便,脂肪 |
| 京巴 | 15 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 膀胱,前列腺 |
| 京巴串 | 7 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 膀胱,前列腺 |
| 京巴串 | 10 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 膀胱,前列腺 |
| 西施 | 11 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 膀胱,前列腺 |
| 西施 | 8 | 雄 | 未去势 | 双侧 | 直肠憩室,蓄便,膀胱,前列腺 |
| 小型串 | 9 | 雄 | 未去势 | 右侧 | 膀胱,前列腺 |



图2 X线显示肿胀的会阴部



图3 切开疝囊, 显露膀胱和前列腺

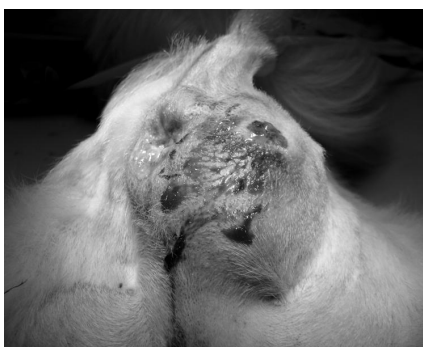


图4 会阴疝, 肿胀, 皮肤化脓出血

症、高钾血症、高磷血症以及中性粒细胞血症等。

2 治疗

药物治疗的目的是减轻症状并防止便秘和排尿困难,防止器官受压等。最根本的治疗方法是疝的手术修补术,尤其是出现排尿障碍或内脏嵌顿时应立即手术。

手术治疗需要综合病例临床表现来选择合适的术方法,常用的修补术有两种。第一种是传统解剖结构的复位术,但是容易发生肛门的暂时性畸形、里急后重和直肠脱出等并发症。第二种是闭孔内肌换位闭合术。此方法比较难操作,尤其当闭孔内肌发生萎缩时。但是这种缝合方法可以使缝

合处平整,肛门变形小,并发症发生几率低^[1]。

2.1 术前准备 ①术前2~3天使用粪便软化剂以及灌肠来清理蓄积大便。术前喂流食或营养膏,以减少粪便的数量。手术前灌肠、清便。②手术麻醉:考虑到老龄犬的身体耐受性问题,最好采用吸入麻醉。上述病例均采用吸入麻醉:麻前用药为阿托品0.05 mg/kg体重,15 min后静脉注射舒泰(Zoletil, 2 mg/kg体重)做诱导麻醉,异氟醚吸入麻醉。③会阴部、尾根、臀部大面积剃毛消毒。采取俯卧、前低后高保定姿势,后躯垫上约10 cm厚的软垫,尾巴向前上方牵引、固定。肛门做荷包缝合。④切口定位:切口起点位于尾根外侧方1~2 cm处,止点位于同侧坐骨结节上方,由上至下做一弧形弯向外侧的切口。

2.2 传统会阴疝修补术 切开皮肤后充分止血,分离皮下组织,可以看到一透明膜状的疝囊。剪开疝囊,放出液体。辨清疝内容物,将脱出的脂肪组织、膀胱、前列腺等送入盆腔。若是肿大的前列腺或嵌闭的膀胱复位困难时,先将前列腺内的积液抽出或穿刺抽出膀胱内尿液再行复位。分离疝囊与其外侧粘连的组织,将剥离的疝囊结扎或送入疝孔中做生物填充。边分离边触摸疝轮周围的肛门外括约肌、肛外提肌、尾骨肌进行定位。肛门外括约肌位于肛门外侧,一般不用分离就能看到;在疝轮的外上方(尾根部)触摸提肛肌和尾骨肌,之后稍作分离就能看到。但是很多情况下由于会阴疝形成的时间较长,肛门提肌已经萎缩,很难找到。此时,应以坐骨结节与耻骨联合之间,贴着坐骨将部分闭孔内肌与坐骨分离,分离到可以将此肌肉向上方提起约1 cm为止。

闭合疝孔:用7号丝线先将肛门外括约肌的上半部分与肛门提肌和尾骨肌作数个结节缝合,暂不打结;再将肛门外括约肌的下半部分闭孔内肌作数个结节缝合,也是暂不打结;每进行一次结节缝合都要用止血钳夹住缝线末端,以免搞乱缝线^[2]。注意阴部内动静脉和神经,避免损伤和压迫。检查修复情况,若缝合有缺损或遗漏可以进行补充缝合。

2.3 闭孔内肌换位修补术 皮肤切开及皮下组织的分离同传统会阴疝修补术,之后切开闭孔内肌的起始缘和坐骨后缘的骨膜和韧带,用骨膜提

升机从坐骨上提升骨膜和闭孔内肌, 向背内侧换位或卷起肌肉, 使它与尾骨肌、肛门提肌和外括约肌对合。若需要可以横断闭孔内肌的肌腱附着点, 覆盖病灶。之后同第 2.2 方法闭合疝孔。

2.4 闭合创口 闭合疝孔后, 缝合皮下组织, 对合两侧皮肤瓣, 剪掉多余的皮肤, 做结节缝合。在整个手术过程中注意不要损伤疝囊下方的阴部动静脉和神经以及其分支后直肠神经。在闭合疝孔应避免对此神经和血管的压迫。

对于双侧会阴疝的病例, 可以同时进行疝的修补术, 但是为了防止术后并发症的发生, 也可以等 3~4 周后视恢复情况再修补另一侧。

2.5 术后护理 连续静脉注射头孢曲松 (50 mg/kg 体重) 3~5 天, 身体状况差或术后食欲差的病例要同时静脉给予营养药。为防止舔舐创面, 头戴伊丽莎白头套。术后 1 周内要限饲, 尽量喂流食。10~14 天拆除皮肤缝线。

3 小结与讨论

3.1 以上所有病例中, 除两只患犬因为闭孔内肌萎缩而采用闭孔内肌换位闭合术外, 其他均采用传统会阴疝修补术。跟主人协商后, 双侧会阴疝的病例采取同时手术的方法。手术操作过程比较顺利, 能够比较合理的完成疝孔的修补。术后 1 周左右会阴部扩张的皮肤即可收紧, 恢复正常排便状态。根据临床经验, 一般情况下采用传统的疝修补术即可治愈患犬; 但是当闭孔内肌发生萎缩时就需要用闭孔内肌换位修补术来修补疝孔。因此, 术者应该根据患犬实际情况选择合适的会阴疝修补方法。

3.2 从临床接触的病例来看, 年龄和性别是发病

的最重要因素之一。根据相关报道, 临床遇到的患犬基本上全是公犬, 平均发病年龄 10 岁左右^[3]。公犬做去势手术可以降低发病率^[4]。

3.3 术前去势术对于促进前列腺萎缩, 减少排便困难, 预防会阴疝的形成作用非常明显。手术的同时做去势手术有助于减少同侧疝的复发以及对侧疝的发生。

3.4 合理的手术操作可以防止术后并发症的发生。较好的手术技术和预防性抗生素的应用减少感染和创口开裂, 也可以尽量降低复发率。术后如果出现疼痛反应或跛行, 可能是坐骨神经受到了压迫, 要尽快拆除压迫神经的缝线。

3.5 术后给予镇痛药—卓比林 (5 mg/kg 体重), 每天一次, 连用 5 d, 首次量加倍), 可以减少肌肉过度牵张和防止直肠脱出。如果发生直肠脱出, 可以在肛门处做一个荷包缝合, 也可以用结肠固定术来防止直肠脱出。有尿毒症的病例要进行输液治疗, 根据病情和治疗情况选择合适的手术时间。患犬术后应进食高纤维高水分的食物, 也可以连续使用 1~2 个月的粪便软化剂。

参考文献:

- [1] 张海彬, 夏兆飞, 林德贵. 小动物外科学 (译) [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008.
- [2] 王洪斌. 家畜外科学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] Hosgood G, Hedlund C S, Pechman R D, et al. Perineal herniorrhaphy: perioperative data from 100 dogs [J]. J Am Anim Hosp Assoc, 1995, 31 (4): 331.
- [4] 董悦农, 姚海峰, 杨万莲. 手术治疗犬会阴疝的体会 [J]. 中国兽医杂志, 2005, 41 (6): 47-48.

(上接第 24 页)

风换气, 保持舍内空气清新, 降低氨气浓度, 从而减少呼吸道病的发生。重视仔猪保温工作, 调节好舍内早晚温差, 并搞好卫生和消毒, 为保育猪提供温暖、舒适的生活环境。

2.2 控制 在每批保育猪未发病前, 提前加药预防是关键 (必须掌握猪场特点, 是什么时候、阶段会爆发此病)。当疫病发生时, 应及早采取措施, 对病猪进行投药治疗, 以减少细菌二次感染引起的死亡。①应用 80% 支原净 125 g+2% 纽弗罗 2 000

g/ 吨饲料进行混饲, 连用 1~2 w。②在饮用水中添加多维, 每 1 000 kg 水投放 300 g, 连用 7~10 d。③病猪隔离治疗, 选用恩诺沙星 0.1 mL/kg 肌注, 1 d1 次, 连用 3~4 d, 或 30% 纽弗罗注射液 1 mL/15 kg, 2 d1 次连用 2~3 次。④病猪采取专人监管和护理, 注意好卫生和消毒工作, 并保持猪舍环境舒适, 以加快病猪的痊愈。⑤猪只治疗处理后, 对仍不见好转或康复差、无价值的病猪, 应及时、果断淘汰, 以防止疫病传播。

我国动物福利的现状及其改进措施

万世平¹, 王 辉², 卓国荣³

(1. 上海市浦东新区动物疫病预防控制中心, 上海 浦东 201200; 2. 湖北省十堰市畜牧兽医局, 湖北 十堰 442000; 3. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 动物福利问题愈来愈成为人们关注的热点, 对我国畜牧业发展的影响越来越大, 直接影响我国动物及其产品的国际性贸易。长期以来的传统的动物饲养方式在很大程度上有悖于动物保护的意识。在我国动物福利刚刚起步, 存在着许多问题, 必须以积极的态度去应对, 以科学合理的方法去解决这些问题, 改善我国目前动物福利落后的状态, 发挥农业大国的优势。

关键词: 动物福利; 畜牧生产; 影响; 对策

中图分类号: S811.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0046-03

近年来, 无论是在国内还是国外畜牧养殖业都取得了显赫的成就, 为人们生活水平的提高和经济的增长作出了巨大的贡献。然而养殖业生产效率的提高却基于人为创造的畜禽设施环境下进行的集约化生产。长期以来人们过于强调追求经济利益, 忽略了对饲养动物的健康生长福利的关心。由于养殖场一味强调经济利益的提升, 长期将饲养动物置于不利于其健康生长, 甚至较为恶劣的生存环境之中, 这不但给动物造成了严重的心理及生理痛苦, 而且对动物源性食品的品质也有一定的影响, 另外, 也带来了许多的生物安全问题。随着人们动物保护意识的提高, 最早在英国等发达国家就有人呼吁关注人类食品安全和畜禽的健康生长, 并且开展了许多相关的研究。在国内, 近年来也有部分人开始意识到这一问题的重要性, 但仍然未受到应有的重视。本文从畜牧业发展的角度出发探讨我国动物保护的改进措施。

1 动物福利的概念

动物福利(animal welfare)由早期西方发达国家学者提出, 是指为使保证动物康乐(well-being)而采取的一系列行为与相应的外部条件, 即动物与环境相一致的精神和生理完全健康的状态, 其内容包括无任何疾病、无行为异常、无心理紧张、压抑和痛苦等^[1]。动物福利包括五项基本原则, 即为动物提供适当的清洁饮水和保持健康和精力所需要的食物, 使其享有不受饥渴的自由; 为动物提供适当的房舍或栖息场所, 能够舒适地休息和睡眠, 使其享有不受困顿不适之苦; 为动物做好防疫, 预防疾病和给患病动物及时诊治, 使其享有不受痛苦伤害的自由; 为动物拥有良好

的条件和处置, 使其享有生活无恐惧感和悲伤感的自由; 为动物提供足够的空间、适当的设施以及与同类动物伙伴在一起, 使其享有表达天性的自由等^[2]。动物福利的要求来自生理和心理两方面, 在生理福利方面要求良好的健康、合理的饲养和安全的畜舍环境, 在心理方面要求安乐、无紧张恐惧和枯燥压抑等^[3]。

2 动物福利对畜牧生产的重要性

2.1 促进畜牧生产能力的提升 重视饲养动物的福利, 为其提供舒适的生长环境, 给予营养完善的饲料, 不仅可以提高饲料利用率, 明显加快饲养动物的生长速度, 还能提升动物机体疾病抵御能力, 降低疫病感染风险, 同时亦可减少动物的异常行为的发生, 降低饲养动物的死亡率并促进动物在适宜的环境中健康生长, 提升了畜牧生产的质量和生产能力。饲养动物在交易运输过程中给予良好的通风环境, 运输时间适宜, 并在宰前提前充分的休息, 饮食及饮水, 以痛苦最小的方式进行宰杀, 可明显提高其屠体的肉品质。

2.2 保障动物源性食品安全和提升经济效益 部分养殖场由于受经济利益的驱使, 在畜牧生产中忽视动物福利, 以求经济效率最大化, 在动物饲料中使用违禁添加剂, 使得有害物质在动物产品中残留, 影响了动物源性食品安全, 危害了人类健康。在畜牧生产中推行动物福利, 拒绝添加违禁添加剂, 不仅可保障动物健康成长, 同时可保障动物源性食品安全。重视动物福利, 减少动物疾病发生几率, 保障了动物的高成活率。在舒适的环境中, 提升了动物生长速度, 在一定程度上提升了动物生产效率, 同时有利于提升动物源性食品品质

量,从而提升畜牧经济效益。

2.3 保障兽医公共卫生安全和生态环境友好 从当前流行的动物源性主要疫病来看,多数为人畜共患病,动物疫病的传播也给人的健康带来了严重的威胁。饲养动物的生活环境恶劣,福利不当,严重削弱了其疫病抵抗力,加大了感染传染病的几率,同时也加大了传染病由动物传染给人的几率。做好动物福利,提升动物疾病抵抗力,便可明显减少传染性病原的易感宿主,切断传染病传播条件,降低疫病传播风险,从而保障了兽医公共卫生安全。畜牧业生产所产生的畜粪、污水和臭气成为对生态环境造成污染的重要原因,通过实施动物福利,为饲养动物提供一个安全型的生存环境,不仅保障了畜禽安全与健康,同时保障了人类友好的生态环境。

2.4 突破国际贸易壁垒并增强国际竞争能力 我国作为农业大国,农业出口占整体出口额较大的比重,其中,动物源性食品为主要出口产品。然而,近年来发达国家通过动物福利立法或者制定苛刻的动物福利标准,限制发展中国家动物源性食品的进口,从而阻碍外国动物源性食品的输入,保护本国市场。我国由于传统的粗放型的生产方式,动物福利从未受到重视,致使我国畜牧业在国际市场中较为被动,产品出口价格较低,贸易出口大减并蒙受较大经济损失。在畜牧生产中实施严格的动物福利,提升我国动物源性食品质量,可以不断缩小与国际贸易要求的动物福利要求之间的差距,突破贸易壁垒,变被动为主动,增强我们畜牧业的国际竞争能力。

3 我国畜牧业的动物福利现状与问题

3.1 动物生活空间受限 对于任何一种动物来讲,为确保其能舒适的自由活动必须保证拥有一定的活动空间。然而,在集约化、工厂化的现代畜牧业生产中,基本上都没有考虑到这一根本福利要求,高饲养密度为其重要特征。高密度致使饲养动物异常行为明显增加,如仔猪多表现为争斗打架,相互咬尾及咬耳,咬栏;养殖场对母猪多采用限位饲养,母猪长期无法走动,咬栏、无食咀嚼等异常行为表现明显;蛋鸡多采用层架式笼内饲养,其活动空间狭小,其正常生活习性无法进行;许多鸭养殖密度太大使得鸭只生活的水环境被污染严重且没有机会下水^[4]。

3.2 动物生活条件恶劣 如果动物没有一个良好的生活环境,谈何生活愉快。许多管理不够完善和基础设施建设不够完备的养殖基地,经常粪便堆积多天不清除,地面潮湿,空气不新鲜。另外,许

多养殖基地缺乏夏季降温设备和冬季供暖设备,不能为动物提供一个适宜的温度环境。甚至有些养殖场建在噪音区,不能保证动物的生活的安静需求。部分养殖场动物饮水条件简陋,缺乏饮水净化措施或不全,更甚者直接采用生产生活废水饲喂动物,其饮用水中可能含有多种致病的微生物及超标的有害金属元素,无法确保畜禽洁净的水源。不洁净的水源直接大大增加了动物感染疾病的几率,同时有害金属元素通过饮水在动物体内残留,也有损于动物源性食品的安全。

3.3 动物饮食不合理 当前我国的饲料状况也令人堪忧,饲料原料生产中农药的使用量逐年递增,致使大量高毒、高残留品种农药在土壤、水体、饲料原料中的含量严重超标,饲料原料如玉米、高粱、麦麸、豆粕、菜籽饼、花生饼、棉粕等受到农药污染在所难免。另外,部分养殖场在饲料中添加违禁添加剂,如一些禁用抗生素、瘦肉精、三聚氰胺或其它药物,以及超量添加铜、锌等微量元素和砷制剂,使有害物质在动物体内残留并聚积,影响动物源性产品的品质,这样不仅不符合动物生产营养需求,还有悖于动物生长发育规律,直接影响动物健康和畜产品的食用安全,同时对人的身体健康构成严重的威胁。

3.4 运输和屠宰行为恶劣 运输和屠宰是畜牧生产中一个十分关键而又非常容易被忽视的环节。活畜禽长途运输是畜禽流通的一种主要方式,在运输过程中,动物高度密聚集,相互挤压受伤受挫,不能活动并缺少休息,尤其夏天环境温度过高,动物易产生严重的运输应激和热应激病,甚至死亡,这都是无视动物福利的严重迫害和虐待动物的行为。在我国畜禽屠宰多采用传统粗暴落后的分散小规模个体屠宰,多在室外露天进行,其肉产品易在宰杀、剥皮、去骨分割等过程中被污染。在农村和城郊监管较难区域内私屠滥宰现象较为突出,并且许多不法商贩利欲熏心,为增加肉重给屠宰的动物大量注水,使动物处于极度痛苦之中^[5]。

3.5 疾病防控与动物保护相冲突 在许多人畜共患病的控制中,划定某一范围内的畜禽或者其他动物一律扑杀,而且在扑杀过程中手段极其残忍。比如2006年在云南、广西等地爆发了严重的狂犬病,为遏制该病的蔓延,当地某县政府下令将境内的狗全部扑杀,许多无辜的生命成为此次风波的牺牲品^[6]。

4 改善我国动物保护的对策

4.1 建立和健全相关法律法规 我国已经出台了

许多关于珍稀动物保护的相关政策法规,还通过一些动物性食品安全标准来强制性规范畜牧生产,然而关于畜牧生产中的动物保护却很少,应该制订一些相关法律法规来健全畜牧生产中的动物保护机制。我国大多数人对动物福利意识淡薄,缺乏动物福利知识,因此在建立健全动物福利法律法规的同时要加强相关知识的宣传与教育,尤其农村和城郊的养殖场、屠宰场,使动物福利为社会广泛接受。

4.2 改善动物的生活环境 提供舒适的生活环境条件是保障畜禽动物福利的重要内容,是提升动物疫病抵抗力的关键措施。根据不同饲养动物的种类及生理阶段提供相应的生活环境条件,建设生态型畜牧场地,应建在地势较高且环境幽雅之处,增加温度和湿度控制设备,提供其生长最适温度和湿度,并保障畜禽舍的通风和光照等;保饲养环境的清洁卫生,完善粪污及排水系统,及时清除生产垃圾及粪水,定期消毒和消灭老鼠、蚊蝇、蟑螂和蝇蛆等有害动物;建立适合的畜禽养殖密度,提供活动场,保证一定的生存和活动空间;设计合理的畜舍,采用半开放式畜舍以及建造室外凉棚和实行散放式制度进行降温防暑工作,舍内安装风扇以加强通风;为畜禽提供充足的清洁饮水;合理处理和利用畜禽粪便等。

4.3 给予环保型的饮食 根据饲养动物不同生长阶段的营养需求,设置科学的饮食结构,为其提供充足的能量、蛋白质、水分、维生素和矿物质等,确保畜禽正常生长发育与健康。同时开展饲料的生物安全监测工作,对发霉变质、腐败有毒以及含有毒性物质超标的饲料进行排除。规范添加剂的使用,按照生物安全剂量添加,严禁添加激素和其他违禁药物。并且需要提供多样化的饲料,多加入些青饲料,让动物也吃到天然绿色食品^[7]。

4.4 加强疾病防控工作 坚持预防为主,管理与治疗为辅的原则,以传染性疾病为主要控制对象,按照科学的免疫程序给饲养动物接种疫苗,同时积极开展免疫效果监测,对疫感染情况和流行趋势进行把控。一旦发病,应及时确定病原,结合实验室诊断结果针对性用药,避免滥用或盲目使用抗生素等,以消除动物发病所带来的痛苦^[8]。同时,做好日常饲养管理工作,以增强饲养动物的疾病抵抗能力。

4.5 改善运输及屠宰条件 尽可能与国际动物福利标准接轨,选择合适的装载密度和运输工具,控制车速,同时避免运输距离过长;在运输前后均在饲料或饮水中添加缓解应激的成分,以调节动

物机体生理机能,增强体力;应妥善安排运输时间,尽量避免在夏季高温时段运输动物,保持通风,必要时应定时对车厢进行淋水降温;运输途中及宰前均应给予动物一定的休息时间,并提供饲料和饮水等。屠宰的过程应该尽可能地轻便而短暂,尽可能使动物们安静且人道地死亡,减轻其痛苦。

4.6 加强行政监督管理 政府部门和行政执法机关要对侵害动物福利要求的饲养、运输、屠宰加强监督管理,特别是要严格查处私屠滥宰、给畜禽注水、滥饲违禁添加剂等既侵害动物福利又威胁人体健康的不法行为。同时积极组织动物保护协会等非政府组织及社会各方人士积极参与对动物福利的保护与宣传,定期开展有关动物福利各项活动。

5 结语

保障动物福利,同时也是保障人类的福利,近年来动物福利问题日益成为人们关注的热点。我国畜牧业中的动物福利问题比较突出,已经深刻影响到我国动物产品的国际市场发展,成为我国动物和动物产品国际贸易的一个新的壁垒。我国的动物福利刚起步,是一个新的课题,相关体系还相当的脆弱。我们必须以积极的态度来应对,充分学习发达国家畜牧业中的动物福利的方法和成就,结合我国畜牧业动物福利发展的现状,积极摸索适合我国动物福利的研究与立法,并将其逐步应用于畜牧生产实际中,改善畜禽的生存生活条件,提升其生活质量和产品品质,保障动物源性食品安全,这对我国发挥农业优势,促进我国畜牧业的安全、持续发展意义深远。

参考文献:

- [1] 邢廷钰. 动物福利与我国畜牧业的持续发展[J]. 饲料工业, 2004, 25(5):1-3.
- [2] Vonne L. Natural living—a precondition for animal welfare in organic farming[J]. Livestock Science, 2006, 100: 71-83.
- [3] 李克杰. 试论在农场动物福利问题上应采取的对策[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(7): 52-54.
- [4] Susan M, Diane B. The relative value of farm animal welfare[J]. Ecologic Economics, 2006, 59:353-363.
- [5] 李凯年. 养禽业应将动物福利纳入日程[J]. 中国家禽, 2004, 26(15):4-8.
- [6] 王雷杰, 宋美娥. 我国农畜动物福利的现状和对策[J]. 中国畜牧业通讯, 2004, (7):41-43.
- [7] 高峰霞, 王月影, 李和平, 等. 加强人兽共患病防制保障公共卫生安全[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(11):21-22.
- [8] Docke's A C, Kling-Eveillard F. Farmers' and advisers' representations of animals and animal welfare[J]. Livestock Science, 2006, 103:243-249.

浅谈细胞培养中微生物污染与防控措施

陈 峥*, 赖月辉, 陈振荣

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

中图分类号: S854.4*3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0049-03

预防细胞培养的微生物污染是指在细胞培养过程中,细菌、霉菌或病毒等微生物侵入细胞培养物中,对细胞的生存造成危害的现象。在生物制品的生产和研究等相关的细胞培养过程中,由于细胞培养的特殊性和培养条件要求高,若受到微生物的污染,这将对实验或生物制品生产带来了严重的危害。

为防止细胞培养过程中受到其他微生物污染,首先应该从污染途径检查,对可能造成污染的每个环节和步骤制定严格的消毒措施;其次判断污染的类型,对不同的污染类型采用提纯细胞群、添加抗生素等措施加以处理和预防。同时制定严格的操作规范以保证污染可以早预防、早发现、早处理。

1 污染类型

1.1 细菌污染 细胞培养中细菌污染较为常见。主要是由于操作不当或是器材消毒不严,或是各种营养成分隐性污染细菌没有被检测出来所造成的。即使在细胞培养液中加入了抗菌素,使得细菌繁殖处于抑制状态,细胞生长不受明显影响,不易被肉眼观察。但随着抗生素的失效,营养液中的细菌大量增殖而造成污染^[1]。

培养的细胞出现细菌污染之后,一般会出现细胞变圆,胞内颗粒增多增粗。污染的细菌由于新陈代谢使培养液 pH 明显下降,含有酸碱度指示剂的营养液颜色则有明显的变化(如 MEM、199 或 1640 等营养液颜色变黄);营养液发臭,明显浑浊;在显微镜下可以看到有细菌样颗粒体的形态。在细胞营养液没有出现浑浊,颜色变黄的情况下,用营养液接种 GP、GA、TG 等培养基,如有细菌菌落

生长可证明该细胞受到了细菌的污染。

1.2 支原体污染 支原体污染不能用肉眼或光学显微镜检查细胞观察出来,带有一定的隐蔽性,易被人们忽视。当细胞被支原体污染后,细胞培养液可能毫无变化,短期内细胞没有明显的病理变化,也可以因为传代或换液而缓解。只有当污染严重时才影响细胞增殖,使细胞脱落^[2]。支原体可以与宿主细胞形成一个共生关系,使污染不断扩大。一旦发生支原体污染,支原体可以通过移液、倾倒液体时产生具有潜在感染力的飞沫和吸附的尘埃,沉积在物体表面。这种污染性尘埃能存活数天甚至数周,使操作环境受到污染,若不及时处理还会产生交叉污染或再次污染。支原体污染常用的检查方法为培养检测法,即取 1 mL 细胞培养液加入支原体液体培养基中,培养 5 天后,观察培养基的颜色变化。如果变黄则怀疑该细胞受到支原体污染。如果不变色,则盲传一代。若颜色变黄,可接支原体固体培养基,于 5%CO₂ 培养箱中培养 3~5 天,观察有无“煎蛋”状支原体菌落。一旦发生污染即淘汰该细胞和培养液。此外,支原体污染还可用荧光染色法^[1]和相差显微镜观察法^[3]等检测方法。

1.3 霉菌污染 霉菌污染和细菌污染比较相似,都可以由无菌操作环境差或者器材等消毒不彻底造成。霉菌污染经常发生在潮湿的季节或者潮湿的操作环境。可以通过肉眼观察细胞生长和培养基培养的方法来检测霉菌污染。霉菌短期内不会引起营养液的浑浊,但是在细胞瓶壁可以见到明显的成片或是成块状的霉菌菌落。在显微镜下可以看到霉菌的菌丝,营养液常可见颜色变黄。在无任何污染的细胞上,抽取细胞培养液放入普通的

培养基上培养,如果见到培养基上有霉菌生长,也可以判断该细胞受到霉菌污染。霉菌污染可以使细胞变形、脱落。霉菌孢子对环境的耐受力很强,普通的消毒液很难清除,所以对操作环境带来严重的危害。

1.4 病毒污染 外来病毒污染最为隐蔽,一经污染难以用常规方法检测到。病毒颗粒细小,侵入到细胞胞内,普通光学显微镜难以观察到。受病毒污染的细胞,细胞培养液清亮,毫无变化。一些具有致病性的病毒会造成细胞变圆、肿胀、脱落等细胞病变现象。可根据这种现象来判断细胞是否感染外来病毒。

外来病毒污染还能借助免疫学方法判断。如用 ELISA 方法检测牛犊丸细胞培养中的 BVDV(牛流行性腹泻)和 BDV(羊边界病毒)污染,此外还有用 PCR、AGP(琼脂扩散试验)和胶体金试纸条方法检测一些特定病毒感染。

1.5 杂质细胞污染 常见于原代细胞培养。原代细胞是通过组织块消化而来的,在消化过程中由于剪裁的组织块不够纯,消化时间把握不好,容易把杂质细胞消化混入原代细胞培养中。杂质细胞污染可以通过镜检观察细胞形态判定。如果混入了杂质细胞,可以通过再次消化的方法,提纯细胞群,从而达到净化细胞的目的。

2 预防与处理

2.1 污染的预防 由于细胞在体外没有抵抗微生物的能力,细胞一旦被污染,多数难于清除。如果不是重要的细胞,一般都建议废弃或者淘汰处理。细胞培养关键在于预防污染而不是清除污染,预防是防止细胞培养过程中发生污染的最好方法。在细胞受到污染早期或者较轻微污染的时候,如果能够及时作出处理,可将部分细胞挽救回来。

在实验和生产过程中污染预防除了在操作环境和原材料上的消毒和无菌处理等手段外,对预防和排除少量的细菌、支原体和霉菌污染可以通过在营养液上添加抗生素来实现。常用的抗生素有:双抗(青、链霉素),庆大霉素、卡那霉素、多粘菌素、四环素、制霉菌素等。使用抗生素来预防污染,通常是多种抗生素联合比单个抗生素的效果好,有的抗生素只有抑制作用没有杀菌效应;如果用量太大,细胞耐受不了,对细胞或者细胞系有毒

性作用,因此特别要注意不同的细胞培养的特点和对抗生素耐受程度的不同。在对具体的细胞选用抗生素,首先对用药的种类和剂量进行筛选以选到既可抑制污染微生物又不影响细胞生长的抗生素。

2.2 污染的处理 处理污染关键是找出污染的源头和途径。判断细胞污染的源头与途径的时,可以借助污染概率来判断。如营养液等原材料受到污染时,表现整批细胞受污染;如果是操作失误而造成的污染,表现只有一小部分细胞受污染。

3 基础保障

3.1 空气消毒 空气是微生物传播的主要途径。细胞培养操作的地方如果与外界隔离不严密或消毒不充分,外界不洁空气进入培养体系而造成污染。培养环境不能设在通风场所。无菌操作应在超净化台内进行。工作时要带上消毒好的口罩,以免因交谈、咳嗽等使外界污染物进入操作面,造成污染。同时尽量避免人员走动,避免引起大量的空气流动致使空气微生物混入而造成污染,操作时把手彻底洗净并用消毒液消毒。如需要培养大量细胞,环境洁净度应达到万级。定期对超净台和培养场地进行空气中细菌含量检查。无菌工作台和过滤网应定期清洗,清洗后用 75%酒精擦拭干净,紫外线照射 40 min 以上。各种培养板照射 3 h 以上,最大限度地洁净环境中的空气。

3.2 器材消毒 各种直接跟细胞接触的培养器皿、器械,如果消毒不彻底和洗刷不干净,将直接影响细胞生长和导致营养液的污染。在培养细胞前,应该对要使用的器械分类,彻底消毒。如玻璃器械和玻璃培养瓶的消毒,采用高压蒸汽灭菌 30 min 以上或干烤消毒 140℃ 2 h 以上,彻底消灭吸附在器械上的各类微生物。

3.3 血清 血清是在细胞培养中提高各种生长因子供细胞生长的重要营养成分。直接作用于细胞,是营养液的重要成分。在制备营养液的过程中须单独添加。但血清在生产制作过程中容易受到支原体或其他病原微生物的污染。使用前应对血清进行细菌和支原体、病毒等潜在病原体的检查,以防止受污染的血清混入细胞培养液中。

3.4 营养液 营养液是直接提供细胞新陈代谢的各种物质。但营养液中也富含其他污染微生物

繁殖所需的营养成分,因此在细胞培养中营养液严格要求处于无菌状态。在营养液制备过程中,采用蔡氏过滤器或者 $0.1\ \mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤,经无菌检查合格后才能使用。

3.5 消化液和双抗等其他液体 消化液和双抗等其他液体也直接作用于细胞,在消化细胞组织和制备营养液时使用。在用于细胞培养之前采用与营养液制备相同的方法将其过滤除菌,分装成小瓶,无菌检测合格之后才能置 -20°C 配用。

3.6 建立制度,规范操作 严格的规章制度可以大大减少污染的概率。在工作过程中禁止非工作人员进入实验室和工作场地。进入工作场地应该更换衣服和鞋,工作时应穿上消毒过的工作服,使用各类器械也要严格根据器械的使用规范来操

作。每天至少消毒一次工作台面和环境。制定有效的防虫防蚊措施。

操作接触各种器械和进行细胞培养时,如果无菌观念不强,操作程序不规范,技术不熟练,使用污染的器皿或瓶塞封瓶不紧等,都可能造成细胞液污染。所以在操作过程中每一个操作步骤都应有火焰的保护下,防止空气中细菌等微生物污染。

参考文献:

- [1] 曾卫东,董青.动物细胞培养中微生物污染的检测[J].浙江畜牧兽医,2003,(2):12.
- [2] 何大澄,张鸿卿,邱相寰,等.细胞培养中的支原体污染问题[J].细胞生物学杂志,1984,6(4):153-156.
- [3] 刘江,姜述德.细胞体外培养过程中霉菌污染的预防[J].国外医学预防、诊断、治疗、用生物制品分册:1995,18(2):61-64.

农业部:五方面举措做好夏季动物疫病防治工作

农业部兽医局副局长李长友7月27日做客新华网,就我国上半年重大动物疫病防控成效的与网友在线交流。李长友在访谈中表示,夏季是重大动物疫情高发季节,农业部采取五方面措施做好夏季动物疫病防治工作。

李长友说,夏季是重大动物疫情高发季节,这里主要有三个因素:一是夏季因为气温高、湿度大,适宜各种细菌、微生物的繁殖,病原微生物的数量比其他季节大大增加。二是由于天气炎热,牲畜容易产生反应,容易感染疾病;三是像蚊子、苍蝇等其他昆虫在夏季大量繁殖,也增加了传播病原微生物的疾病,很容易造成虫媒传播疫病的发生。针对这个特点我们多次组织专家研判疫情形势,周密部署疫情防控工作,夏天主要加强了几方面的工作:

一是加强夏季消毒灭源,我们制定了消毒灭源的工作方案,动员防治机构、养殖企业、农户多方参与,有效防止病原微生物滋生。

二是强化基础免疫,在春季集中免疫的基础上,加强日常补免和免疫效果的监测。对于一些常见病各地也结合本地实际情况,做好免疫工作,以减少损失。

三是及时开展疫情监测报告。加大动物疫情监测力度,特别是养殖大县,增加病原学监测数量,扩大范围,加大频次,及时发现和消除疫情隐患。继续坚持口蹄疫疫情日报告制度。一旦发现疑似疫情,按规定及时上报。

四是依法严格检疫监管。进一步强化产地检疫和屠宰检疫,抓好流通环节检疫监管。对于病死畜禽及其产品要严格实行“四不准一处理”,严防流入市场,切实保障动物产品质量安全。

五是切实提高应急处置能力。强化应急防控机制,加强应急培训和演练,扎实做好各项应急准备。一旦出现突发疫情,要迅速果断处置,在最短的时间内把疫情控制在最小范围内,确保不发生扩散蔓延。按照农业部的部署,各地也在积极采取措施,做好夏季动物疫病防治工作。

目前,全国重大动物疫情还是继续保持着平稳的态势。(资料来源:新华网)

娟姗牛青霉素过敏反应的诊治及体会

郑海华

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001)

中图分类号: S859.79.99

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)04-0052-01

青霉素过敏是多种动物发生,以全身症状为特征的一种速发型变态反应性疾病,其特点是发病快,病程急,抢救不及时往往会发生死亡。某奶牛场自2005年引进一批娟姗牛以来,已出现多例娟姗牛青霉素过敏现象,现将发病情况及治疗体会小结如下:

1 青霉素过敏现象

1.1 青霉素子宫给药过敏现象 这几头娟姗牛均为青年牛,发情时直肠检查发现子宫较硬,于是用青霉素钠盐320万IU和硫酸链霉素100万IU溶于40mL 0.9%生理盐水中,注入子宫内以净化子宫。30min后,发现牛只倒地不起,全身皮毛竖起,肌肉震颤,牙关紧咬,不停流涎,眼睑发肿变紫、流泪,阴户红肿发紫,呼吸加快。个别过敏牛还出现腹部鼓胀现象。根据用药情况,判定为青霉素过敏,此类现象共发现3例。

1.2 青霉素乳注给药过敏现象 这几头娟姗牛均为产后不久,发生乳房炎,按常规治疗。挤净发炎乳房的奶汁后,用0.9%生理盐水反复冲洗3~4次,最后给患乳乳孔内注入40mL溶有青霉素160万IU和链霉素100万IU的生理盐水。30min后发现牛只卧地不起,全身发抖,不停流涎,眼睑发肿变紫、流泪,阴户红肿发紫,整个乳房呈紫色,尤其四个乳头变为暗紫色,呼吸加快,全身乏力,久赶不起。根据用药情况,判定为青霉素过敏,此类现象共发现3例,既有经产牛,也有初产牛。

2 治疗

原则上以消除过敏症状为主,根据过敏轻重情况给予适当补液。笔者的经验是:对青霉素过敏牛只立即颈部皮下注射盐酸肾上腺素2mg/头,乳注给药过敏的,在注射盐酸肾上腺素的同时挤

干净奶汁。一般给药30min后牛只逐步恢复正常。对于症状严重的,1h后再注射盐酸肾上腺素2mg/头,3h后完全恢复,精神、食欲正常。

3 讨论

3.1 尽管在使用青、链霉素时发生过敏反应,但根据青、链霉素各自的药物特性,作者认为娟姗牛的过敏反应是由青霉素引起的。引起过敏反应的途径有子宫内注入青霉素,乳注青霉素等,目前尚未发现有肌注青霉素过敏的现象。

3.2 盐酸肾上腺素为治疗青霉素过敏的首选药。笔者自工作以来,仅发现娟姗牛有青霉素用药过敏现象,以往饲养的荷斯坦牛、西门塔尔牛、短角牛、楼来牛等都未出现过此现象,这值得饲养娟姗牛养殖户的注意。

3.3 在娟姗牛需要用青霉素类药物治疗时,最好改用氨基类青霉素,可避免或减少过敏反应的发生。

日本新技术提高猪人工授精成功率

日本广岛大学副教授岛田昌之日前宣布,他率领的研究小组通过改良冷冻保存猪精子的方法,大幅提高了猪冷冻精子人工授精的成功率。

新方法是分离精液中的精子和精浆,只冷冻保存精子。研究人员发现,精子运动能力低下是保存用溶液内含有的钙在解冻后被精子吸收造成的。因此他们制造出了含钙吸附剂和免疫抑制成分的液体,免疫抑制成分可使精子在进入母猪的子宫时不会遭到排斥。

研究人员利用离心机,从采自公猪的精液中分离出精子,脱水后冷冻保存,并使组织不因冷冻而受到破坏。解冻后,与人工合成的液体混合后使用。使用这种精液对母猪进行人工授精,其中约80%的母猪能顺利诞下猪崽。每次生产猪崽10头左右,与自然交配水平相当。利用这种新方法,可以分散保存肉质好的猪的精子,在发生口蹄疫等情况下可较容易繁殖仔猪。(资料来源:<http://www.chinapig.cn/>)