

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 王贵平 舒鼎铭

孙彦伟 蔡建平 王政富 刘彩霞

特邀编委:

陈 峰 余丽明 徐建浩 黄小建

陈小云 郑庆禄 贺湘仁 李 岩

林旭堃

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:12月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

目 录

·专题综述·

- 多西环素的药理学进展及临床应用概述.....李 伟, 杨 阳(3)
- 猪瘟兔化弱毒疫苗的研究概况.....吴文福, 岑小清, 等(6)
- 奶牛亚急性瘤胃酸中毒的发生与危害..... 谿银强(9)
- 畜禽养殖场空气污染的營養性防治对策.....孙利娜, 谷子林, 等(12)

·畜牧技术·

- 抗母猪生殖应激剂和抗仔猪断奶应激剂对断奶仔猪血清乳酸脱氢酶同工酶的影响初探.....陈 琼, 廖三赛, 等(16)
- 娟姗牛在广西的繁殖性能初报..... 刘瑞鑫, 吴柱月, 等(19)

·兽医临床·

- 犊牛大肠杆菌病的诊治报告..... 黄伟明, 张国军, 等(21)
- 几种常用激素在母牛繁殖中的使用方法探讨..... 欧聚寿, 李 铭, 等(22)
- 做好山区农村高致病性禽流感防控工作的主要对策..... 宋玉胜(24)

·试验研究·

- 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量RT-PCR鉴别诊断方法的建立.....孔留五, 张桂红, 等(25)
- LUXTM 荧光 PCR 快速检测沙门氏菌的研究.....许如芬, 陈 茹, 等(30)
- 四种兽用抗生素的体外抑菌效果评价.....宋德平, 谢勇飞, 等(35)
- 白介素-15 真核表达质粒对猪瘟免疫增强效果的研究.....夏 芳, 罗满林, 等(38)
- 野生草食动物源多杀巴氏杆菌荚膜分型的研究.....夏晓潮, 苏 力, 等(40)

·宠物园地·

- 几种常见犬感染性血液病的诊治体会.....张 丽, 周方军(43)
- 犬胸段食道异物阻塞经胃切开手术治疗一例..... 谭志文, 余殷兴, 等(46)

·经验交流·

- 以循环经济促畜牧业可持续发展.....汤道玲(48)
- 猪场容易忽视的几个问题.....吴同山(50)

·信息之窗·

- 本刊征稿启事.....(42)
- 2009“永顺杯”优秀论文评选启事.....(49)
- 欢迎订阅本刊.....(51)
- 2009年本刊总目录.....(52)

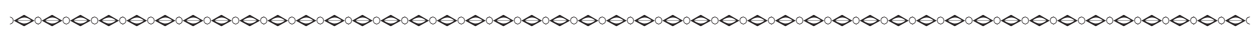
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Nov.2009 Volume 34,Number 6 (Total No.148)

Main Content

- Pharmacological progress of deoxytetracycline and its clinical application*.....
..... Li Wei, Yang Yang(3)
- The occurrence and consequences of subacute ruminal acidosis in dairy cows*Huo Yinqiang (9)
- Nutritional strategy for controlling air pollution in livestock farms* Sun Lina, Gu Zilin, et al (12)
- The influence of antistressagent for cow's reproducing stress and antistressagent for piglet's weaning stress on the functions of lactic dehydrogenase isozymes in serum of weaning pigs*.....
.....Chen Qiong, Liao Sansai, et al (16)
- The first report on the reproductive performance of Jersey in Guangxi district*
.....Liu Ruixin, Wu Zhuyue, et al(19)
- The usage of several commonly used hormones on reproduction of diary cows*.....
..... Ou Jushou, Li Ming, et al(22)
- SYBR Green real-time RT-PCR assay for detection and differentiation of classical and mutational PRRS virus of Northern American type*.....Kong Liuwu, Zhang Guihong, et al(25)
- Development of a LUXTM PCR for rapid detection of Salmonella* Xu Rusu, Chen Ru, et al(30)
- Evaluation of bacteriostatic effect of four veterinary antibiotics in vitro*... Song Deping, Xie Yongfei, et al(35)
- Immunostimulating efficacy of IL-15 eukaryotic expressed plasmid on the immunization of classical swine fever*Xia Fang, Luo Manlin, et al(38)
- Capsule typing of Pasteurella multocida strains isolated from wild plant-eating animals*
.....Xia Xiaochao, Su Li, et al(40)
- Diagnosis and treatment of several common canine infectious blood diseases*
.....Zhang Li, Zhou Fangjun (43)



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 gdxmsykj@163.com

多西环素的药理学进展及临床应用概述

李伟¹, 杨阳²

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 广州市科虎生物技术研究开发中心, 广东 广州 510540)

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0003-03

多西环素(doxycycline)又名强力霉素、脱氧土霉素,是半合成的四环素类抗菌药。与天然四环素类药物(如土霉素、四环素)相比,多西环素具有抗菌活性和组织穿透力更强、体内分布广、生物利用度高、半衰期较长等优点。目前,多西环素在我国已广泛用于畜禽细菌性疾病的防治,尤其在治疗大肠杆菌病、巴氏杆菌病及支原体感染等方面效果显著。本文综述了该药近年来的研究与临床应用概况,以期为其在兽医临床上的合理应用提供科学资料。

1 抗菌机理与抗菌活性

1.1 抗菌机理 多西环素主要的作用位点是核糖体,它通过与细菌核糖体30S小亚基的结合,进而干扰氨基酰-tRNA与30S小亚基结合,使氨基酰-tRNA不能进入mRNA上的受位,从而抑制蛋白质合成时肽链的延长,使蛋白质合成受阻。此外,它还可以阻止蛋白质肽链释放,达到抑菌的作用。

1.2 抗菌活性 多西环素具有高效、长效、广谱等优点,属快速抑菌剂,高浓度时有杀菌作用。许多革兰氏阳性菌及阴性菌如链球菌、炭疽杆菌、破伤风杆菌、沙门氏菌、布氏杆菌等都对多西环素敏感。此外,多西环素还对一些支原体、衣原体、螺旋体、立克次氏体等有一定的抑制作用。李仲兴等^[1]测得多西环素对124株表皮葡萄球菌和42株溶血葡萄球菌的MIC₉₀分别为2 mg/L和4 mg/L,表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌对多西环素的敏感率分别为96.77%和100%。体外抑菌试验表明多西环素对大肠杆菌O₇₈的MIC为4 mg/L^[2]。对猪肺炎支原体的MIC为0.219 μg/mL^[3]。对绵羊肺炎支

原体的MIC和MBC值分别为0.208 μg/mL和0.333 μg/mL^[4]。对鸡败血支原体的MIC值为0.125 μg/mL^[5]。

2 药动学

2.1 吸收和分布 多西环素在动物体内吸收迅速,但不同种属的动物或同种动物个体间的差异以及生理状态等也会导致药动学参数的差异。多西环素在不同动物体内的半衰期分别为:犬和猫分别为6.99 h、4.56 h,泌乳山羊16.63 h,母牛和母羊24.75 h;犊牛9.5 h。Luis等^[6]报道多西环素在山羊体内的最大药物血药浓度(C_{max})为2.130±0.950 μg/mL,达峰时间(t_{max})为3.595±3.348 h;Abd EI-Aty等^[7]报道给山羊单次静脉注射5 mg/kg盐酸多西环素时,呈现出无吸收二室开放模型特点,分布半衰期(t_{1/2α})为0.52±0.006 h,消除半衰期(t_{1/2β})为4.62±0.11 h,药时曲线下面积(AUC)为6.92±0.33 μg/mL·h。单次肌肉注射相同剂量的盐酸多西环素,C_{max}为1.60±0.06 μg/mL,t_{max}为0.86±0.06 h,生物利用度(F)为99.4%,AUC为6.89±0.33 μg/mL·h。

王金花等^[8]以2.5 mg/kg单剂量肌肉注射盐酸多西环素注射液,猪体内的C_{max}为(2.811±0.136) mg/L,t_{max}为(1.910±0.213) h。结果表明,盐酸多西环素在药物动力学参数方面存在较大的种属间差异性,在猪体内吸收更加完全,滞留时间较长。何家康等^[9]报道,猪按20 mg/kg静脉注射盐酸多西环素注射液后的AUC为108.15 mg/h·L,表观分布容积(V_{d(ss)})为1.04 L/kg,表明药物在体内分布较为广泛。多西环素具有较高的脂溶性,因而易透过生物膜,口服后较容易吸

收,人的口服生物利用度为 90%~100%^[10]。

多西环素在动物体内与血浆蛋白的结合率各有不同。Riond 等^[11]对 6 头猪静脉注射 20 mg/kg 体重的多西环素,研究该药在仔猪体内的药代动力学,结果显示多西环素与血浆蛋白的结合率为 93.1±0.2%。Abd EI-Aty 等^[7]报道在非哺乳期山羊,多西环素与血浆蛋白的结合率为 32.8%。

2.2 生物转化与排泄 多西环素在动物体内的代谢产物主要有 4-epidoxycycline (4 号位异构体) 和 6-epidoxycycline (6 号位异构体)。Croubels 等^[12]测定多西环素和 4-epidoxycycline 在火鸡肝脏和肌肉组织中的含量,可以检测到 4-epidoxycycline 的存在。孙小平等^[13]对多西环素在人体内的药物动力学研究结果表明,该药从体内消除慢,且尿排率不高,这说明肾不是其主要排泄器官,对肾功能不全者无明显体内蓄积。多西环素主要在肝脏以结合或络合的方式灭活,再经胆汁分泌入肠道,随粪便排出,另外一部分可通过肾脏排出。

3 药效学

曲长春等^[14]用利福霉素钠联合多西环素治疗急性布氏杆菌病,治愈率达 96.7%。袁延文等^[15]以诺氟沙星为对照药物,研究了盐酸多西环素治疗鸡白痢和禽霍乱的效果,结果盐酸多西环素对鸡白痢的治疗效果显著好于诺氟沙星,治愈率、死亡率差异显著 ($P < 0.05$);对禽霍乱的疗效好于诺氟沙星,治愈率差异不显著 ($P > 0.05$),但死亡率差异显著 ($P < 0.05$)。

张军凤等^[16]应用盐酸多西环素冻干粉针治疗猪附红细胞体病或其与细菌性疾病的混合感染,疗效确实、毒副作用小、方法简单快捷。黄宏业等^[17]试验发现长效盐酸多西环素高、中、低剂量组对猪喘气病的治愈率分别为 76.7%、66.7%、46.7%,与阳性对照组相比差异均极显著。莫肖恒等^[18]用强力霉素注射液治疗猪气喘病,治愈率高达 95.35%。

4 毒性与残留

4.1 毒性 多西环素是四环素类药物中毒性最小的一种,但使用不当也会产生一些不良反应,如盐酸多西环素可引起二重感染。方宝霞等^[19]检索 Pub Med 数据库 1994-2005 年多西环素致消化道

损伤与胃溃疡病例,共收集到 17 例。李松杨等^[20]报道了一例因腹泻误服过量的多西环素 (3 g),10 min 后感到恶心、上腹不适,诊断为药物性肾损害,经治疗后症状消失。

4.2 残留 农业部 2002 年 12 月 24 日修订并发布的《动物性食品中兽药最高残留限量》,对盐酸多西环素的规定如表 1 所示。该标准中还规定了其残留标识物为多西环素,日允许摄入量 (ADI) 为 0~3 μg/kg 体重。

表 1 盐酸多西环素在不同动物食品中的最高残留限量
单位: μg/kg

动物种类	肌肉	肝脏	肾脏	皮脂
牛	100	50	30	
猪	100	300	600	300
禽	100	300	600	300

国内外对有关多西环素的残留检测方法报道很多,较常用的是高效液相色谱 (HPLC) 法。王旗等^[21]建立了 HPLC 法测定血清中多西环素,最低检出浓度为 10 μg/mL。Croubel 等^[22]报道,给火鸡以 25 mg/kg 体重的剂量,连续口服盐酸多西环素 4 d,测得盐酸多西环素在肝脏和肌肉的消除半衰期分别为 77.7 h 和 78 h,达到最高残留限量浓度以下的时间分别为 12 d 和 14 d;对猪以 10.5 mg/kg 体重的剂量,饮水口服盐酸多西环素,每天一次,连用 5 d,结果显示,给药期间的血液浓度在 0.83~0.96 μg/mL 之间,停止给药后 36 h,血浆中已检测不到药物。通过对组织中药物的测定,最后设定休药期为 3 d。

5 临床应用

多西环素因其广泛的抑菌作用,在兽医临床上主要用于防治畜禽的支原体病、大肠杆菌病、沙门氏菌病、巴氏杆菌病、布氏杆菌病、鹦鹉热及急性呼吸道感染。同时也被广泛应用于水产养殖和养蜂中预防和治疗多种感染性疾病。张丽明等^[23]报道,复方盐酸多西环素可溶性粉对鸡白痢的治疗推荐剂量为 15 mg/L,混饮 (以盐酸多西环素计),连用 5 d,对鸡白痢可达到显著疗效。

梅家模等^[24]研究表明,在 28℃ 条件下,多西环素对钩端螺旋体具有较强的抑杀效果,对 15 群 15 型钩端螺旋体最小抑杀菌浓度分别为 2

$\mu\text{g/mL}$ 和 $4\ \mu\text{g/mL}$; 模拟人体体温 (37°C 培养) 条件下多西环素含量为 $0.25\ \mu\text{g/mL}$ 时, 对钩端螺旋体仍有较好的杀灭效果, 含量 $0.125\ \mu\text{g/mL}$ 时, 仍有抑制作用。

在治疗人类疾病上, 多西环素主要用于治疗敏感的革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性杆菌所致的上呼吸道感染、扁桃体炎、老年慢性支气管炎等, 也用于治疗霍乱、斑疹伤寒、恙虫病、支原体肺炎等以及预防恶性疟疾和钩端螺旋体感染等。贾蓓等^[25]采用随机双盲对照临床观察, 以阿奇霉素为对照, 对 103 例患呼吸道或泌尿道感染的病人进行治疗, 结果显示注射用多西环素和阿奇霉素的痊愈率分别为 63.46%、66.67%, 有效率分别为 90.38%、88.24%, 细菌清除率分别为 91.30%、90.70%, 两者无显著差异 ($P>0.05$)。

近期, 有报道美国研究人员 Kenneth Brandt 及其同事研究发现, 长期使用多西环素可使有膝骨关节炎的超重病人关节间歇变小, 但是否可治疗骨关节炎, 尚需进一步的临床试验。

6 小结

综上所述, 多西环素抗菌谱广, 抗菌效力强, 吸收后体内分布广, 组织渗透性良好, 药物与血浆蛋白结合率高, 体内维持药效时间长。兽医临床上常用于防治畜禽的呼吸道、消化道、泌尿道等细菌的感染。

参考文献:

- [1] 李仲兴, 王秀华, 孟晓洁, 等. 多西环素、米诺环素和糖肽类药物对凝固酶阴性葡萄球菌的抗菌活性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2005, 4(4): 147-150.
- [2] 江丽, 雷淑珍. 氟苯尼考与多种抗菌药物联合应用对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2008, 33(3): 42-44.
- [3] 韦建强, 王志强. 替米考星及其他抗菌药对猪肺炎支原体的体外联合抑菌试验[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(6): 3-4.
- [4] 刘聚祥, 林密, 孙继国, 等. 八种抗菌药物对绵羊肺炎霉形体的体外敏感性研究[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(3): 7-10.
- [5] 陈方文, 万蔚. 六种抗菌药对鸡败血霉形体的体外抑菌试验[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2005, (5): 13.
- [6] Luis J, Castro, Ana M, et al. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration[J]. The Veterinary Journal, 2009, (180): 389-395.
- [7] Abd El-Aty A M, Goudah A, Zhou H H. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats[J]. Pharmacol Res, 2004, (49): 487-491.
- [8] 王金花, 操继跃, 翟克影, 等. 盐酸多西环素在猪体内的药物动力学及其残留[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(11): 1313-1316.
- [9] 何家康, 祝万菊, 周丽光, 等. 盐酸多西环素缓释注射液在猪体内的药物动力学[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(2): 175-180.
- [10] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 214-217.
- [11] Riond J L, Riviere J E. Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in young pigs[J]. Am J Vet Res, 1990, 51(8): 1271-1275.
- [12] Croubels S, Vermeersch H, De Backer P, et al. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys[J]. Journal of chromatography B, 1998, (708): 145-152.
- [13] 孙小平, 黄文祥. 单剂注射用盐酸多西环素的药理学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10): 624-626.
- [14] 曲长春, 武坤莎, 钱起龙, 等. 利福霉素钠联合多西环素治疗急性布氏杆菌病疗效观察[J]. 传染病信息, 2006, 19(4): 214-215.
- [15] 袁延文, 殷生章, 赵恒寿, 等. 盐酸多西环素对鸡白痢和禽霍乱的疗效试验[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(9): 48-50.
- [16] 张军凤, 杨晓东. 应用盐酸多西环素冻干粉针治疗猪附红细胞体病及其混合感染[J]. 兽药疫苗, 2006, (3): 45-49.
- [17] 黄宏业, 邱春媚. 长效盐酸多西环素-蟾酥注射液对猪喘气病的疗效试验[J]. 广西畜牧兽医, 2007, 23(2): 69-71.
- [18] 莫肖恒, 黎江义. 介绍一种猪气喘病的治疗方法[J]. 广西畜牧兽医, 2001, 17(4): 32-33.
- [19] 方宝霞, 陈富超, 李开俊. 多西环素的不良反应与临床应用[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(20): 4084-4085.
- [20] 李松杨, 刘小艳. 误服过量多西环素致肾损害 1 例[J]. 药物流行病学杂志, 2006, 1(2): 122-123.
- [21] 王旗, 蒋激扬, 谢蜀生. 高效液相色谱法测定血清中的多西环素[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(3): 224-226.
- [22] Croubels S, Vermeersch H, De Backer P, et al. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys[J]. Journal of chromatography B, 1998, 708: 145-152.
- [23] 张丽明, 任剑. 复方盐酸多西环素可溶性粉对鸡白痢的疗效试验[J]. 中国畜牧业通讯, 2008, (15): 48-49.
- [24] 梅家模, 李志宏, 章承锋, 等. 强力霉素对钩端螺旋体病的预防效果研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(7): 610-613.
- [25] 贾蓓, 卓超, 李崇智, 等. 注射用盐酸多西环素随机对照治疗细菌性感染的疗效与安全性[J]. 药品评价, 2005, 2(5): 354-358.

猪瘟兔化弱毒疫苗的研究概况

吴文福, 岑小清, 任向阳

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 猪瘟病毒兔化弱毒株因其优良的免疫原性, 成为我国至今唯一使用的猪瘟疫苗株。本文就猪瘟兔化弱毒株的生物学特性、猪瘟兔化弱毒组织疫苗和细胞疫苗的研制以及疫苗的应用进行了综述。

关键词: 猪瘟; 兔化弱毒

中图分类号: S859.79⁹.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0006-03

19世纪末, 研究人员发现猪瘟(CSF)耐过猪可免受猪瘟强毒的再次感染, 从此揭开了猪瘟疫苗研究的序幕。1947年, 马闻天等试制了CSF灭活疫苗。1951年, 何正礼、方时杰等用石门系强毒株成功研制出CSF结晶紫灭活疫苗^[1], 为预防本病起到了积极作用。但由于灭活疫苗存在免疫力不够坚强, 免疫期短, 产生免疫保护力慢, 生产成本高, 且繁殖猪瘟强毒存在散毒的危险等缺点^[2], 未能进一步推广应用。1982年起全国停止了该疫苗的生产, 其后在《中华人民共和国兽用生物制品规程》(1992年版)中将该疫苗删除^[3]。

1946年开始, 国内外研究人员采用非猪源动物或用细胞传代驯化猪瘟病毒, 培育猪瘟弱毒疫苗。世界上较为著名的猪瘟弱毒疫苗有: 用细胞培养驯化而成的日本细胞弱毒GPE株、法国的Thireval株和经家兔传代减毒培育而成的中国兔化弱毒株(Chinese strain, 简称“C株”)^[1]。猪瘟兔化弱毒疫苗株性能稳定, 对本动物安全可靠, 保护性好, 成为我国至今唯一使用的猪瘟疫苗品种, 也得到国际同行认可。本文对猪瘟兔化弱毒株的生物学特性、疫苗研制与应用作一综述。

1 猪瘟兔化弱毒株的生物学特性

我国自1950年开始摸索猪瘟兔化弱毒, 从许多猪瘟强毒株中选择对异源宿主适应强, 且免疫原性好的毒株。1954年, 周泰冲等^[2]用猪瘟强毒经家兔传代减毒, 并经继代纯化成功培育出一株能适应家兔的猪瘟病毒变异毒, 对猪无致病性, 但仍保持良好的免疫原性, 这就是国内外广泛使用的中国猪瘟兔化弱毒株。

1.1 猪瘟兔化弱毒株的遗传特性 用猪瘟兔化

弱毒接种家兔仅产生特征性的热反应, 但不致死家兔。通过家兔传代430代, 其特征性热反应率可达97%, 继续传代至985代, 经鉴定其遗传性未变, 仍保持其特征性热反应; 将346代猪瘟兔化弱毒连续通过易感断奶仔猪7代, 毒力不返强, 说明此弱毒株遗传性能稳定^[2]。

1.2 猪瘟兔化弱毒对猪的安全性

猪瘟兔化弱毒免疫猪可出现轻微的病毒血症, 但免疫后4~32天内不会从尿中排毒, 免疫猪与非免疫猪同圈饲养60天, 不发生接触感染^[1]; 注射怀孕1~3个月的母猪, 不引起流产、死胎; 接种未吮初乳的初生仔猪, 无不良反应, 能产生有效的免疫力^[2]; 脾毒用10倍稀释乳剂, 细胞毒用原液接种无猪瘟中和抗体的健康易感猪5 mL, 接种猪精神、食欲、体温等均无异常反应, 说明猪瘟兔化弱毒对猪安全可靠。

1.3 猪瘟兔化弱毒的免疫原性

用猪瘟兔化弱毒接种无猪瘟中和抗体的健康敏感猪后, 72 h可产生坚强的免疫力, 可在发生猪瘟疫区对未发病的猪只紧急预防接种, 以控制猪瘟流行; 用脾淋苗免疫断奶后无母源抗体仔猪的免疫期为18个月^[2]; 脾毒用10⁻⁵稀释乳剂, 接种无猪瘟中和抗体的健康易感猪5头, 1 mL/头。注射后10~14天, 连同条件相同的对照猪3头, 注射猪瘟强毒1 mL/头, 观察16天, 对照猪全部发病死亡, 接种猪全部健活, 说明猪瘟兔化弱毒具有良好的免疫原性。

2 猪瘟兔化弱毒组织疫苗的研制

2.1 猪瘟兔化弱毒脾淋组织疫苗 (简称脾淋苗)

自1954年成功研制出猪瘟兔化弱毒, 我国在猪瘟弱毒疫苗生产工艺和推广应用等方面做了大量工作。1956年, 在农村或基层就地制造脾淋组织湿

苗,随制随用。1958年,随着冷冻干燥技术的应用,全国各兽医生物制药厂进行了批量生产^[2],50年来该疫苗的应用对猪瘟的防控起到了重要作用。但由于当前我国缺乏制苗用家兔的质量标准,很难保证脾淋苗的纯净性,而且优质家兔数量有限,无法满足猪瘟防疫的需要。

2.2 猪瘟兔化弱毒乳兔组织疫苗 (简称乳兔苗) 受当时合格兔源的限制,生产的猪瘟脾淋苗产量远不能满足防疫的需要。为了扩大疫苗产量,1964年研制推出猪瘟乳兔苗^[2],用猪瘟兔化弱毒接种初生乳兔,收取乳兔肝脾及除去头爪的胴体组织,可大大增加单兔疫苗产量,降低成本,但相对脾淋苗,病毒效价较低且不稳定。

2.3 猪瘟兔化弱毒牛体组织疫苗 (简称牛体反应苗) 猪瘟牛体反应苗系采用猪瘟兔化弱毒接种健康牛,收取感染牛的脾脏和淋巴结制成,可提高疫苗产量。但因存在牛病毒性腹泻/粘膜病病毒(BVD/MDV)等传染病潜在的风险,且牛体反应苗的质量难于控制,未能进一步推广应用,在1992年版《中华人民共和国兽用生物制品规程》中被删除^[3]。

3 猪瘟兔化弱毒细胞疫苗的研制

3.1 猪瘟兔化弱毒乳猪肾细胞疫苗 (简称乳猪肾细胞苗) 1974年黑龙江省兽医研究所用乳猪肾细胞生产猪瘟活疫苗获得成功,1978-1980年在全国大量推广使用^[2]。但因为存在猪同源细胞生产疫苗有带猪瘟野毒的潜在风险,因此,1981年起全国停止了该疫苗的生产。

3.2 猪瘟兔化弱毒羊肾细胞疫苗 (简称羊肾细胞苗) 1980年和1982年相继研制成功猪瘟绵羊肾细胞苗和猪瘟山羊肾细胞苗,分别采用绵羊肾原代细胞和山羊肾原代细胞生产猪瘟弱毒活疫苗^[2]。但由于绵羊、山羊多饲养在偏远地区,绵羊、山羊的来源有限,羊肾细胞制作工艺较复杂且易污染,因此,猪瘟羊肾细胞苗的生产受到很大限制。

3.3 猪瘟兔化弱毒牛睾丸细胞疫苗 (简称牛睾丸细胞苗) 1985年成功研制了猪瘟牛睾丸细胞苗,采用初生犊牛睾丸细胞培养猪瘟兔化弱毒,不但可提高疫苗产量,在质量上也有了进一步提高^[2]。经20多年全国大面积使用,证明猪瘟牛睾丸细胞苗安全,免疫效果良好。

为了保证猪瘟细胞苗的安全,在细胞苗生产过程中必须进行严格的中间检测,用于生产的血清必须进行BVD/MDV抗体检测,培养细胞必须进

行细胞系统的检验。20多年来,猪瘟牛睾丸细胞苗中间检测结果表明,牛血清和牛睾丸细胞污染BVD/MDV的现象越来越严重,已严重影响猪瘟细胞苗的正常生产。

3.4 猪瘟兔化弱毒传代细胞疫苗 (简称传代细胞苗) 由于我国牛群感染BVD/MDV比较普遍,用牛睾丸原代细胞制苗,有BVD/MDV等外源病毒污染的可能,同时,近年来用牛睾丸原代细胞制苗,产毒滴度不高,且批间差异大,给疫苗产量、效力的提高带来困难。用传代细胞生产猪瘟活疫苗,可避免细胞外源病毒污染,批间差异小,生产工艺稳定,病毒滴度高,可明显提高疫苗产量和质量。

2007年,中国兽医药品监察所和广东永顺生物制药有限公司共同研发采用传代细胞生产猪瘟活疫苗获得成功。用猪瘟传代细胞苗不同的接种剂量和方法对不同年龄的猪进行了安全性试验,结果表明:无论是单剂量或超剂量接种,还是单剂量重复接种,猪瘟传代细胞苗对于各种年龄猪和怀孕母猪都是安全的。用传代细胞培养猪瘟兔化弱毒,病毒含量可达 10^6 RID/mL (兔体感染量)以上,猪瘟传代细胞毒液用 10^6 倍稀释悬液,接种无猪瘟中和抗体的健康易感猪5头,每头接种1 mL。注射后10~14天,连同条件相同的对照猪3头,注射猪瘟强毒1 mL,观察16天,对照猪全部发病死亡,接种猪全部健活,说明猪瘟传代细胞苗具有良好的免疫原性。

4 猪瘟兔化弱毒疫苗的应用

4.1 猪瘟兔化弱毒在国外的应用 1957年后,我国将猪瘟兔化弱毒相继赠送给匈牙利、朝鲜、前苏联、罗马尼亚、保加利亚、越南等国应用。匈牙利首先用猪瘟兔化弱毒“C株”疫苗与英、美的商品苗Rovac、SFA、Mcy、Swivat和Tnuevat等苗进行比较试验,结果证明“C株”疫苗比其它几种更安全有效。并用“C株”制造疫苗推广应用,其后逐步被欧洲各国所采用^[2]。

1972年,法国将猪瘟兔化弱毒“C株”适应羊肾细胞制苗,在法国生产疫苗并推广应用,证明猪瘟兔化弱毒遗传性能稳定、不排毒、无残余毒力、毒力不返强、免疫效果优异。罗马尼亚的Popa等经多年的比较研究,在其1972年发表的报告,肯定了猪瘟兔化弱毒“C株”的优越性,认为远比美国Rovac株安全^[2]。

几十年来,几乎所有欧洲国家和少数拉美国家

都采用了猪瘟兔化弱毒“C株”, 消灭和控制了其国家的猪瘟。猪瘟兔化弱毒疫苗已被国际上公认是效果最好的猪瘟弱毒疫苗, 其产生免疫力快, 免疫力坚强, 保护率高且持久, 遗传性稳定, 不排毒、无残余毒力、毒力不返强、不产生病毒血症, 可安全地免疫预防任何怀孕期母猪和哺乳仔猪, 不引起胎儿畸变、流产、死胎, 不影响受精率、产仔率、存活率等^[2]。

4.2 猪瘟兔化弱毒在国内的应用

4.2.1 猪瘟兔化弱毒免疫效果评价

不论是猪瘟兔化弱毒组织苗, 还是猪瘟兔化弱毒细胞苗, 在我国的猪瘟防治方面, 都起到了巨大的作用, 已被证明该毒株安全有效。但随着近年来我国各地频发的所谓“非典型猪瘟”或“慢性猪瘟”而怀疑猪瘟兔化弱毒疫苗的免疫效果。为了明确我国生产的猪瘟兔化弱毒疫苗对我国流行的猪瘟野毒的免疫保护水平, 1997年, 丘惠深等^[4]用来自兰州、广东生物药厂等单位生产的猪瘟活疫苗免疫无猪瘟中和抗体的健康敏感猪, 以5株分离自我国不同地域并经全面鉴定的猪瘟野毒分别进行攻击, 结果免疫猪100%保护, 对照猪全部死亡, 说明猪瘟兔化弱毒对我国当时流行的猪瘟野毒具有良好的免疫保护效果。2008年, 孙建华等^[5]用猪瘟兔化弱毒疫苗免疫无猪瘟中和抗体的健康敏感猪, 以广西猪瘟流行野毒株进行攻击, 结果免疫猪100%存活, 对照猪全部发病、死亡50%, 说明猪瘟兔化弱毒株对广西猪瘟流行野毒株仍具有良好的免疫保护作用。因此, 我们有理由相信我国目前使用的猪瘟兔化弱毒仍能抵御猪瘟野毒的攻击。

4.2.2 猪瘟兔化弱毒疫苗的合理应用

多年的生产实践证明, 要做好猪瘟的防治工作, 必须采取综合的防控措施, 其中制定科学合理的免疫程序和应用安全高效的优质猪瘟疫苗是两个关键的环节。

4.2.2.1 建立科学合理的免疫程序

免疫接种一直是猪瘟防治中的重要环节。随着各种猪瘟免疫抗体监测方法的建立与完善, 规模化猪场已科学的制定适合本场的猪瘟免疫程序。超前免疫是猪瘟免疫接种的一种方法。猪瘟感染, 除垂直传播外, 更多的是通过带毒母猪长期散毒, 感染初生仔猪。由于母猪免疫猪瘟疫苗的强度和频率加大, 仔猪母源抗体一般可维持至35日龄以上, 在20日龄进行猪瘟活疫苗首免时, 母源抗体可不同程度干扰猪瘟弱毒株在仔猪体内复制, 从而影响免疫效果。

超前免疫(亦称乳前免疫或零时免疫)正是为

排除母源抗体对猪瘟疫苗接种的干扰, 并在可能感染田间强毒前让疫苗株病毒快速占领免疫靶位, 诱导免疫反应, 使初生仔猪获得免疫保护。1979年, 法国学者 Coitheiev 等首先提出超前免疫原理^[6,7]。台湾省赖秀穗(1979)^[8]采用此方法进行猪瘟超前免疫田间试验, 在疫区接种仔猪超过1000窝, 在较短时间内就控制了猪瘟。我国在20世纪80年代初起, 有不少关于初生仔猪猪瘟超前免疫的报道, 都认为超前免疫是一种有效的免疫接种方法之一。超前免疫成败的关键在于: 一是接种时机的把握, 猪瘟兔化弱毒疫苗接种前不能吸初乳, 免疫接种后60~120 min吸初乳为佳; 二是使用优质疫苗, 接种适宜的免疫剂量^[9,10]。

20世纪90年代初, 根据当时猪瘟流行情况, 结合国内外猪瘟超前免疫的实践, 考虑初生仔猪免疫猪瘟容易出现过敏反应的实际情况, 广东省生物药厂开发出专用于猪瘟超前免疫的“零免”猪瘟细胞苗, 1999年注册了“零免”商标, 并在全国推广使用, 应用效果确实。

4.2.2.2 使用安全高效的猪瘟兔化弱毒疫苗

目前普遍认为, 猪瘟免疫失败的主要原因有: 一是猪瘟野毒持续感染, 二是猪瘟疫苗质量不高。许多研究资料表明, 猪瘟疫苗质量不高, 免疫剂量不足导致免疫猪不能有效抵抗猪瘟野毒感染, 导致免疫猪持续带毒; 种猪携带的猪瘟野毒可经胎盘垂直传播, 造成仔猪先天免疫耐受或胚胎死亡; 带毒妊娠母猪所产死胎或存活的带毒猪排毒污染环境, 反过来造成易感猪感染发病或持续带毒; 先天免疫耐受猪或持续带毒猪接种猪瘟疫苗不能产生免疫保护反应, 导致免疫失败^[11,12]。

我国多年来猪瘟疫苗质量不高的主要原因是猪瘟细胞疫苗常规生产工艺技术和原辅材料质量等条件的限制, 生产的猪瘟细胞疫苗病毒滴度不高, 有的可能污染BVD/MDV等外源病毒。欧洲多国用猪瘟兔化弱毒疫苗成功消灭了猪瘟, 欧洲药典规定用猪瘟兔化弱毒株“C株”疫苗免疫时, 肌注剂量为100PD₅₀/头(猪半数保护量), 相当于400RID^[13]。而我国2005版兽药典规定猪瘟活疫苗(兔源)每头份病毒含量≥150RID^[14]。我国台湾猪瘟细胞苗配苗用细胞毒液以1.6×10⁵RID/mL为合格, 而我国原规程为5×10⁴RID/mL, 显然, 我国猪瘟活疫苗的质量标准低于国际标准。因此, 研制使用安

(下转第15页)

奶牛亚急性瘤胃酸中毒的发生与危害

豁银强

(襄樊学院化学工程与食品科学学院, 湖北 襄樊 441053)

摘要: 亚急性瘤胃酸中毒(SARA)是一个大多数牛场普遍存在的奶牛代谢性疾病。围产期、干物质采食量(DMI)过高、日粮配制差及采食模式变化过大等奶牛均易发生亚急性瘤胃酸中毒,继而造成干物质采食量下降、纤维素消化率降低、乳成分改变及引发腹泻等疾病。本文对奶牛亚急性瘤胃酸中毒的病因及危害等方面进行了简述。

关键词: 奶牛; 亚急性瘤胃酸中毒; 危害

中图分类号: S856.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0009-03

奶牛亚急性瘤胃酸中毒(Subacute ruminal acidosis, SARA)是由于食入能量过高而粗纤维物质较少的饲料致使过量有机酸在瘤胃蓄积所引起的一种消化道异常,以瘤胃内容物pH值每天长达3~5 h低于5.6的反复出现为特征^[1,2]。SARA引起的生理状况变化不仅扰乱瘤胃正常的功能,破坏瘤胃内的正常微生物区系,从而影响奶牛的健康,在SARA发生率较高的牛群,往往具有高淘汰率和死亡率,牛群奶产量降低,从而造成重大经济损失^[3]。

1 发病率

在欧美等发达国家,SARA是奶牛场关注的主要问题。美国的研究表明,泌乳早期和泌乳中期奶牛SARA患病率分别达19%和26%^[4,5]。Kleen等^[6]对荷兰18个牛场检测发现,围产期奶牛总SARA发病率是13.8%,不同牛场发病率从0~38%不等。Tajik等^[7]对伊朗10个奶牛场检测发现,泌乳早期和泌乳中期奶牛SARA患病率分别达29.3%和26.4%。

SARA因降低产奶量和产奶效率,使动物过早淘汰和增加死亡率,影响养殖场的经济效益。据估计,SARA使美国奶牛业每年损失5亿~10亿美元,仅产奶量一项指标,受影响母牛每天损失就高达1.12美元^[4,5]。

2 发病原因

SARA的发病机制到目前为止尚不明确,但主要发病原因包括:围产期应激、干物质采食量(DMI)过高、日粮配制差及采食模式变化过大^[8]。

2.1 围产期 受生殖激素分泌改变的影响,出现

了生理和代谢过程的一系列变化,这些应激会影响奶牛能量平衡,从而导致体况变差、免疫力减弱等一系列疾病,SARA就是其中一种。干奶期日粮向泌乳日粮的转换,是引起奶牛SARA的主要原因^[9]。与干奶期相比,泌乳期日粮精粗比增加,大量的可发酵碳水化合物在瘤胃发酵,产生较多的短链脂肪酸(SCFA)。这些有机酸主要通过瘤胃微生物转化和瘤胃壁吸收,但此时瘤胃内微生物还没能迅速适应瘤胃内环境的变化,数量相对不足,瘤胃壁乳突也短,吸收面积小,致使瘤胃内SCFA有较多的累积,瘤胃pH低于正常值而发生SARA^[10]。

2.2 高采食量 研究表明,高产奶牛因采食量较多,患SARA的风险性也较大^[8],这可能与瘤胃内可发酵碳水化合物的量以及发酵产酸量均随着DMI的增大而增加有关^[11]。Firkins^[12]利用DMI、消化率及反刍时间建立的回归模型表明,随着DMI增加,流通速率随之增加,瘤胃可降解淀粉百分含量随之降低,但瘤胃可降解淀粉总量却随之增加。动物每日淀粉摄入量与酸中毒的严重程度有直接关系。Preston^[13]证实肉牛育肥期发生SARA是由于DMI突然增加引起的,并提议采用限制最大进食量饲喂模式,结果发现与自由采食相比,执行严格的限制进食制度可显著降低酸中毒的发生率。在生产中,为使能量、进食量最大化而饲喂高精日粮,是诱发SARA的主要原因,对于高产动物来说更是如此,DMI高的动物本身患SARA的风险就大^[8]。

2.3 日粮配比及加工不当 目前普遍认为,日粮配比不均衡或加工处理不当,是反刍动物患SARA

的重要诱因。Dado^[14]研究发现,给育肥肉牛饲喂低水平有效纤维(eNDF)日粮,瘤胃 pH 值明显降低,低于 5.5 的持续时间明显延长,增加了瘤胃酸中毒发生的可能性。Heinrich 等^[15]推荐奶牛全混合日粮(TMR)中的颗粒成分至少应该有 40%长于 8 mm。但是对曼尼托巴(Manitoba)奶牛场的调查发现,至少 25%的奶牛场使用的 TMR 比这一推荐值短,其物理有效纤维(peNDF)含量低于干物质(DM)的 16.5%,这使得这些奶牛场处于 SARA 高发危险中。一般而言,饲料颗粒大小直接影响瘤胃缓冲能力。若精饲料粉碎太细,可使瘤胃微生物与淀粉的接触面积增加,淀粉的发酵速度加快,发酵更为完全,使瘤胃 pH 值下降。增加日粮中纤维含量可以抵消粗饲料长度过短带来的副作用,但当日粮中含有大量长度大于 1.5 cm 的粗饲料时也容易引发 SARA,其原因可能与反刍动物挑食有关^[16]。

2.4 饲喂模式变化 饲喂方式对瘤胃酸中毒的发生具有很大影响,增加饲喂次数将有助于减少瘤胃 pH 值的波动。每天饲喂精料 3~4 次,可避免采食后瘤胃 pH 值波动,有效减少 SARA 的发生。在连续且定时定量供给全混合日粮条件下,动物自身也能有效地调控瘤胃 pH 值波动。Pritchard^[17]研究发现,将正常饲喂时间推迟 2~4 h 后再给料,会增加患 SARA 的可能性。饲喂全混合日粮可避免动物出现挑食现象,稳定瘤胃内环境,使瘤胃发酵更加平稳,与粗精分饲相比,可有效降低反刍动物患 SARA 的风险。目前,国内外大多数的科研试验均采用短期内提高精料水平或禁食 12 h 或 24 h 后再饲喂大量精料的方式,来诱导反刍动物发生 SARA,这足以凸现了不规范的饲喂方式是引发 SARA 的主要因素之一。

3 对奶牛的影响

3.1 降低采食量 DMI 降低是 SARA 的一种常见临床症状。Krcarski-Hunt 等^[18]研究表明,患 SARA 奶牛 TMR 采食量比健康奶牛低 25%。导致奶牛采食量下降的一个原因是瘤胃的蠕动减弱。有研究人员认为,较低的瘤胃 pH 值会降低瘤胃的蠕动。高精料含量日粮使瘤胃内 SCFA 产量增加、pH 降低,最终导致瘤胃蠕动变弱。还有研究人员认为,瘤胃蠕动变弱是由细菌分泌的内毒素引起。目前已经确定瘤胃蠕动减弱是由大肠杆菌产生的毒血症引起的^[3]。瘤胃渗透压的升高也会导致 DMI 降

低,瘤胃内 SCFA、葡萄糖和乳酸含量的增加使瘤胃渗透压升高,使瘤胃内流增加,进而导致动物的采食量下降^[19]。Krause 等^[1]提出,纤维消化率降低及炎症也可能是 DMI 降低的原因,奶牛不同器官的炎症会降低采食量。

3.2 降低纤维消化率 Plaizer 等^[20]通过向 TMR 内添加谷物颗粒诱导奶牛产生 SARA,发现粗饲料中性洗涤纤维(NDF)在 24 h 和 48 h 的原位降解率分别降低了 20.5%和 24.8%,且谷物诱导的 SARA 使混合干草 NDF 在 24 h 和 48 h 的原位的消化率分别降低了 19.6%和 21.8%。SARA 引起纤维消化率降低的原因,很可能是纤维分解菌对酸比较敏感。这些细菌通常不能耐受 pH 值低于 6.0 的酸性环境,SARA 将减少瘤胃中的细菌数量,进而降低纤维消化率。SARA 引起纤维消化率的降低,减少了日粮的净能含量,可能会影响奶牛采食量^[3]。

3.3 改变乳成分 SARA 会降低奶牛的乳脂率。一个大型牛场的田间研究表明,SARA 使产奶量每天降低 2.7 kg,乳脂率和乳蛋白率分别降低 0.3%和 0.12%^[3]。乳脂率的降低是由于瘤胃受酸中毒的影响,改变了其发酵模式^[4]。Baumann 等^[21]研究表明,乳脂率降低很大程度上是由于不正确的饲喂方式引起的。例如日粮精粗比过高、饲料成分经过加工变得更容易发酵、日粮中添加不饱和脂肪酸等。大量的研究表明,高精料日粮在发酵过程中使瘤胃乙酸含量降低,丙酸含量升高,瘤胃 pH 值降低。向高精日粮中添加缓冲剂,能防止乳脂降低综合症,并且使瘤胃 pH 恢复正常^[22]。其原因可能是,日粮添加缓冲剂能够减少瘤胃 11-反式十八烯酸的形成,11-反式十八烯酸能够抑制乳腺乳脂的合成^[4]。

3.4 腹泻 腹泻一直与奶牛场发生 SARA 联系在一起。SARA 患牛粪便结构松软,色泽微亮、微黄色、糖醋味,充满了细小的气泡,比正常情况含有更多的未消化纤维或谷物^[5,8]。粪便含有气泡和腹泻表明,来自瘤胃的大量可发酵碳水化合物在 SARA 患牛后消化道广泛发酵,产生挥发性脂肪酸(VFA)和 CO₂ 等气体,VFA 能够被吸收,微生物蛋白被分泌到粪便内,产生的气体使粪便含有气泡^[3]。

导致粪便发生变化和腹泻的原因之一,可能是由于大量来自瘤胃的可发酵碳水化合物在后消

化道继续发酵。另外一个原因可能是瘤胃发酵过程中产生大量的 SCFA,使消化道渗透压升高,这种高渗情况在 SARA 奶牛中比较常见,由于高渗环境使消化道内吸收较多的水,粪便变稀,导致腹泻^[4]。

4 结语

SARA 对奶牛福利和奶牛场效益都有重要影响。采食高消化性日粮的高产牛群极易发生 SARA。饲喂奶牛过量谷物能够短暂提高产奶量,但长远来看,这些获得可能会被 SARA 诱发的健康问题所抵消。研究奶牛亚急性瘤胃酸中毒的病因及其危害,对于进一步加强奶牛场的饲养管理,提高奶牛场的经济效益具有重要意义。目前,奶业生产者和营养学家面临的挑战是:不发生 SARA 前提下,如何饲喂奶牛实现能量摄入和产奶量达到最佳水平。

参考文献:

- [1] Krause K M, Oetzel G R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2006, 126: 215-236.
- [2] AlZahal O, Kebreab E, France J, et al. Ruminal temperature may aid in the detection of subacute ruminal acidosis [J]. *J Dairy Sci*, 2008, 91: 202-207.
- [3] Plaizier J C, Krause D O, Gozho G N, et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences [J]. *The Veterinary Journal*, 2009, 176: 21-31.
- [4] Kleen J L, Hooijer G A, Rehage J, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review [J]. *J Vet Med. A*, 2003, 50 (8): 406-414.
- [5] Enemark J M D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review [J]. *The Veterinary Journal*, 2009, 176: 32-43.
- [6] Kleen J L, Hooijer G A, Rehage J, et al. Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds [J]. *Vet Rec*, 2009, 164: 681-683.
- [7] Tajik J, Nadalian M G, Raoofi A, et al. Prevalence of subacute ruminal acidosis in some dairy herds of Khorasan Razavi province, northeast of Iran [J]. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 2009, (10): 28-32.
- [8] Stone W C. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle [J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87 (E. Suppl.): E13-E16.
- [9] Nocek J E. Bovine acidosis: Implications on laminitis [J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 1005-1028.
- [10] Krause K M, Oetzel G R. Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88: 3633-3639.
- [11] Allen M S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber [J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 1447-1462.
- [12] Firkins J L. Optimizing rumen fermentation. In: *Proceedings of Tri-State Dairy Nutrition Conference* [C]. The Ohio State University, 2002. 39-54.
- [13] Preston R L. Feeding program to minimize rumen acidosis. In: *Proceedings of the 16th Western Nutrition Conference* [C]. Saskatoon, Saskatchewan, 1995, 245-266.
- [14] Dado R G, Allen M S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk [J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78 (1): 118-133.
- [15] Heinrichs J, Kononoff P. Evaluating particle size of forages and TMRs using the new penn state forage particle separator [D]. DAS 02-42. Pennsylvania State University, University Park. PA, USA, 2002, 3.
- [16] Beauchemin K A, Rode L M. Compressed baled alfalfa for primiparous and multiparous dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 1994, 77: 1003-1101.
- [17] Pritchard R H, Bruns K W. Controlling variation in feed intake through bunk management [J]. *J Anim Sci*, 2003, 81: E133-138.
- [18] Krcarski-Hunt H, Plaizier J C, Walton J P, et al. Short communication: Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2002, 85: 570-573.
- [19] Owens F N, Secrist D S, Hill W J, et al. Acidosis in cattle: A review [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 275-286.
- [20] Plaizier J C, Keunen J E, Walton J P, et al. Short communication: effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows [J]. *Canadian Journal of Animal Science* 2001, 81: 421-423.
- [21] Baumann D E, Grinari J M, Baldi A, et al. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low milk-fat syndrome. In: *Fifth international workshop on the biology of lactation in farm animals* [J]. *Livest Prod Sci*, 2001, 70: 15-29.
- [22] Khorasani G R, Kennelly J J. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactate Holstein cows [J]. *J Dairy Sci*, 2001, 84: 1707-1716.

畜禽养殖场空气污染的營養性防治对策

孙利娜^{1*}, 谷子林², 李素敏¹, 刘亚娟²

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省山区研究所, 河北 保定 071001)

摘要: 本文主要阐述了畜禽养殖业空气污染物的产生途径、特点及其危害, 并提出了相应的防治对策, 以有效控制畜禽养殖场的空气污染问题, 促进畜禽养殖与生态协调发展。

关键词: 畜禽养殖业; 空气污染; 防治对策

中图分类号: S821.49

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0012-04

当前, 畜禽养殖场空气污染已经成为一个不可忽视的环境污染源, 污染物的主要成分为恶臭气体、尘埃和散发在空气中的微生物。其中, 畜牧场发出的恶臭是造成空气污染的主要原因^[1]。恶臭气体主要有氨、硫化物、甲烷等有毒有害成分, 不仅直接或间接危害人畜健康, 而且会引起畜禽生产力降低, 导致养殖场周围环境恶化^[2~3]。采取相应的措施, 减少或控制空气污染源已成为社会关注的焦点。为此, 本文就畜禽养殖场空气污染的相关问题进行阐述, 探讨有效的治理方法, 以促进畜禽养殖与生态协调发展。

1 畜禽养殖场空气污染物的产生途径

畜禽养殖场的空气污染物主要来自于畜禽粪便、污水、饲料残渣、垫料、动物尸体等腐败分解; 家畜的新鲜粪便、消化道排出的气体, 皮脂腺和汗腺的分泌物、畜体的外激素、粘附在体表的污物等也会散发出不同畜禽特有的气味。动物从饲料中吸收养分, 同时将未消化的养分以粪便的形式排出, 其粪尿中所含有机物大体可分成碳水化合物和含氮化合物。碳水化合物在有氧条件下分解释放热量, 大部分分解成 CO₂ 和水; 在无氧条件下, 氧化反应不完全, 可分解成甲烷、有机酸和醇类。含氮化合物主要是蛋白质, 在酶的作用下可分解成氨基酸, 氨基酸在有氧条件下继续分解, 最终产物为硝酸盐类; 而在无氧条件下可分解成氨、乙烯醇、二甲基硫醚、硫化氢、甲胺、三甲胺等恶臭气体^[4~5]。

2 畜禽养殖场空气污染物的特点及其危害

2.1 常见空气污染物的特点 畜禽养殖场生产中的空气污染物的成分复杂, 主要是恶臭气体, 主要成分为二氧化碳、氨、硫化氢、甲烷、吡啶、粪臭素(甲基吡啶)以及脂肪族的醛类、硫醇和胺类等。

但主要以氨、硫化氢、硫醇类、粪臭素为主^[6]。

2.1.1 氨 氨是无色且有强烈刺激性气味的气体。在畜舍中, 氨主要是由细菌和酶分解粪尿产生的。根据舍内空气采样测定, 氨的含量少者为 6~35 mg/kg, 多者可达 150~500 mg/kg。其含量的多少取决于家畜的饲养密度, 另外还和畜禽舍地面结构、舍内通风换气情况、管理水平以及舍内粪污的去除有关。氨的比重小, 在温暖的舍内一般升向舍顶, 但由于氨发生在地面和家畜周围, 因此在畜舍地面含量也较高, 特别是在潮湿的舍内。如果舍内通风不良, 由于水汽不易逸散, 舍内氨的含量就更高了。当空气中氨的浓度很大时, 就会对人和动物产生毒害作用。一些国家规定, 舍内氨的最高允许浓度为 25.7 mg/L。鸡对氨特别敏感, 因此, 鸡舍内氨的最高浓度为 19.8 mg/L。

2.1.2 硫化氢 硫化氢是无色且具特殊腐蛋臭味的可燃气体, 并具有刺激性和窒息性。在畜禽舍, 硫化氢主要来自于新鲜粪便、含硫有机物厌氧降解。家畜采食了高蛋白饲料而消化不良时, 硫化氢的产量最大。在通风良好的畜舍, 硫化氢含量一般不超过 4.3 mg/kg。如果通风不当或管理不善, 空气内的浓度会大大增加, 甚至达到中毒的程度。硫化氢产自于地面和畜床, 密度愈大, 愈靠近地面浓度越大。据地面 30.5 cm 处的浓度为 3.4 mg/L, 而在 122 cm 处为 0.4 mg/L。硫化氢的毒性很大, 可溶于呼吸道和眼结膜, 造成损伤。

2.1.3 硫醇类 硫醇具有强烈的臭味, 类似于蓝洋葱, 它主要是微生物分解粪尿中的有机物质产生的, 在 0.01 mg/L 时就会明显刺激嗅觉。一般无毒性, 但它是气味难闻, 令人作呕。

2.1.4 粪臭素 粪臭素有强烈的臭味, 由微生物

分解色氨酸产生。在这些恶臭气体中,以氨气和硫化氢对人畜影响最为严重。臭气的浓度主要与粪尿中磷酸盐及氮含量成正比,一般鸡粪高于猪粪,猪粪高于牛粪。此外,畜牧养殖场恶臭强度的扩散范围与养殖场的规模、生产管理方法、温度、风力等因素均有关,一般扩散范围在100~1 000 m。当这些恶臭气体在空气中达到一定的浓度,就会对人和动物产生有害作用。

2.2 空气污染物的危害 畜禽养殖场粪尿、废弃物所产生的恶臭气体,会对周围的空气造成污染,成为动物和人患病的传染途径。当恶臭气体散发到空气中,除引起不快、产生厌恶感外,恶臭的大部分成分对人和动物有刺激性和毒性。长时间的吸入低浓度的恶臭气体,会导致呼吸受到抑制而引起慢性中毒。氨、硫化氢、硫醇、二甲基硫醚、有机酸和酚类等恶臭物质均有刺激性和腐蚀性,引起呼吸道炎症和眼炎;脂肪族、胺、醇类和酯类等恶臭物质,对中枢神经有强烈的刺激作用,引起不同程度的兴奋或麻痹作用;长时间吸入会降低代谢机能和免疫机能,导致动物和人发病率升高。此外,养殖场产生的二氧化碳和甲烷气体,引起全球性的气温变暖。其中,牛羊等反刍动物是温室效应产生的重要来源,给大气环境造成严重的影响^[7]。而在畜禽养殖场的和散发在空气中的微生物,也是引发人和动物疾病的重要传染源。总之,这些有害气体的污染是呈空间性和立体性的。因此,从某种意义上讲,养殖场的空气污染对环境的影响要超过固体粪便和污水的影响。

3 畜禽养殖场空气污染的营养对策

由于规模养殖带来的环境污染问题日趋突出,已成为世界性公害。为解决畜禽排泄物的污染和恶臭气的问题,长期以来国内外科学家曾研究了许多处理技术和方法,如粪便的干处理、堆肥处理和恶臭气处理技术等,以及干燥法、热喷法和沼气法等。这些技术在治理畜牧污染方面都具有良好的效果^[6]。而采取合理的营养措施,提高畜禽的饲料利用率,可减少畜禽粪尿中氮、磷的排出量,减少畜禽场恶臭气体,是控制畜禽场空气污染的有效途径。

3.1 采用饲料改进技术 日粮中营养物质不完全吸收是畜禽舍恶臭和有害气体产生的主要因素。通过提高日粮营养物质消化率,可以增加机体营养物质沉积,减少舍内有害气体的产生,尤其是提高饲料中氮和磷的利用率,降低畜禽粪便氮、磷的排出,从而有效减少畜禽污染物的排放^[8]。

3.1.1 科学设计日粮配方 科学设计日粮,用理想蛋白质模式,利用合成氨基酸添加剂平衡日粮氨基酸,不仅可减少氮的排放,而且可减少含硫氨基酸降解产生的硫化氢,色氨酸降解产生的吲哚类物质,芳香族氨基酸和酪氨酸降解产生的苯酚类物质对环境的污染^[9]。研究证明,采用氨基酸平衡日粮,粗蛋白每降低1个百分点,则氨气的浓度降低11%左右,氨气的释放量降低10%~20%。用合成赖氨酸、蛋氨酸、色氨酸和苏氨酸来进行氨基酸营养平衡,代替以粗蛋白为标准的配合饲料,在不影响日增重的前提下,猪粪中氮的排出量可减少40%,粪的排出量减少33%。

3.1.2 改变饲料品质和物理形态 通过改进原料的粉碎程度和混合均匀度,可明显提高饲料中营养物质的消化率和利用率,减少饲料浪费,减轻环境污染。此外,良好的制粒技术可以使畜禽采食平衡,而膨化技术则改变了主要营养物质(糖类、蛋白质和脂肪)的分子结构,提高消化率降低大豆等饲料原料的免疫原性,从而减少饲料浪费。在生产中,要针对不同畜禽采食习性,选择适宜的饲料加工类型。通常,蛋鸡采食量比较少,常采用粉料饲喂;肉鸡采食量比较大,采用颗粒饲料饲喂效果较好,有效减少了饲料浪费。在家兔上,让家兔采食颗粒饲料可取得较好的效果。秦长川^[10]等人通过用颗粒料和粉料的饲喂生长肉兔的效果观察发现,饲喂颗粒饲料组肉兔的饲料利用率比饲喂粉料组提高了24.6%,且有效避免了挑食,减少了饲料浪费。同时,在加工过程中经过高温高压可起到消毒及杀灭病菌、虫卵和霉菌等作用,减少和预防疾病的发生。

3.2 使用绿色饲料添加剂 选用高效率、无污染的“绿色”饲料添加剂也是治理畜禽排泄物污染的重要措施之一。

3.2.1 微生物制剂 微生物制剂又叫活菌剂或生菌剂,指用在动物体内正常的有益微生物经特殊工艺制成的活菌制剂,它既包括微生物生长促进剂,也包括益生菌。应用微生物制剂饲喂动物,可促进畜禽体内的微生态平衡发生变化。微生物在体内代谢旺盛,可以明显提高畜禽机体对各种营养物质的吸收,从而加快生长速度,提高饲料利用率。此外,用EM技术对畜禽粪便进行无臭化处理,可以改善畜禽场环境卫生条件。李维炯等^[11]报道,用微生物制剂饲喂畜禽或处理粪便,能有效地消除粪便恶臭,抑制蚊蝇孳生。

3.2.2 酶制剂 酶是由生物体产生的一类具有高

度催化活性的物质, 又称生物催化剂。饲用酶制剂是通过特定生产工艺加工而成的含单一酶或混合酶的工业产品。目前, 使用酶制剂来提高饲料中能量的利用率和蛋白质、植酸磷的消化率已取得很大进展。纤维素酶、阿拉伯木聚糖酶、 β -葡聚糖酶等可分解纤维性饲料原料, 蛋白酶可直接促进蛋白质原料的分解, 提高氮的利用率^[12]。张申等^[13]报道, 在断奶仔猪的玉米-豆粕日粮中添加 0.1% 的饲用酶制剂, 结果发现, 添加酶制剂组的日增重比未添加组提高 8.84%, 饲料转化率提高 9.95%。

3.2.3 中草药添加剂 中草药添加剂含有多种氨基酸、维生素、微量元素等营养物质, 能增进机体新陈代谢, 促进蛋白质和酶的合成, 提高繁殖力和生产性能, 增加饲养效益。目前, 在生产中应用的中草药添加剂饲料添加剂种类很多: 有麦芽、山楂和麦饭石等既具有营养作用, 又能治疗某些疾病, 可提高机体的免疫力与抗病力; 有黄芪、双花黄连、大蒜、辣椒和胡椒等, 含有色素和活性物质, 可提高瘦肉率, 改善肉质及风味, 也可改善肉的嫩度、滋味、多汁性和汤味^[14]。于辉等^[15]研究报道, 在 0 日龄商品代仙湖肉鸭基础日粮分别添加 1.5% 的补气活血、疏肝健脾的中草药饲料添加剂(白术、柴胡、当归、大蒜、红辣椒、丹参、生姜等)和 1.5% 补肾益脾、活血降脂的中草药饲料添加剂(白术、当归、大蒜、红辣椒、山楂、金樱子、泽泻等), 观察中草药对仙湖肉鸭生产性能和肠道微生物的影响发现, 两种中草药饲料添加剂组的饲料利用率均较未添加组分别提高了 3.8% 和 2.4%, 且在一定程度上促进肠道内有益菌的繁殖, 改善肉鸭的生产性能。总之, 这些中草药添加剂毒副作用小, 无耐药性和残留公害, 应用前景广阔。

3.2.4 有机微量元素添加剂 过去广泛使用的无机微量元素, 由于其利用率低, 且易受 pH 值、脂类、蛋白质、纤维、草酸、氧化物、维生素、磷酸盐、植酸盐及霉菌毒素等诸多因素影响, 使其被动物吸收的数量远小于理论值。近来发现, 使用有机微量元素可提高微量元素的生物利用率, 促进生长, 增加免疫功能, 改善胴体品质。高铜高锌日粮对仔猪确实有显著的促生长或防止腹泻等效果, 但是长期使用高剂量铜锌, 大量多余的铜和锌随着粪便排出体外, 对生态环境造成严重的污染。目前, 在生产中推广应用的有机微量元素添加剂包括有机锌、有机硒、有机铁、有机锰等, 此外, 还包括蛋氨酸锌、蛋氨酸铜、赖氨酸螯合铁等微量元素螯合

物, 在生产上应用均取得较好的效果。何河等^[16]观察蛋氨酸铜对猪血清铜锌含量及粪铜锌排泄量的影响, 结果发现, 添加中等水平的有机蛋氨酸铜吸收利用率比高剂量硫酸铜高, 且可减少粪铜、锌的排泄。总之, 有机微量元素添加的应用, 对减少促进畜禽健康, 减少环境污染就有积极的意义。

3.2.5 生物活性肽 生物活性肽就是对动物具有特殊生理功能或生理作用的肽类, 这些作用包括激素样作用、免疫调节作用、抗菌作用、抗氧化作用以及具有与矿物质结合的特性, 对动物的消化、吸收、矿物质代谢、促生长、免疫以及刺激产乳、调节神经、防治疾病等方面有重要作用。近年来已有多种生物活性肽从微生物、植物及生物体内分离出来, 开发利用活性肽在饲料上将有着广阔的前景, 同样对减少环境污染具有积极的作用。目前, 在生产中应用的生物活性肽的种类很多, 按功能分类, 有生理活性肽(包括抗菌肽及抗病毒肽、神经活性肽、激素调节肽、免疫活性肽等)、调味肽、抗氧化肽、营养肽等。它们作用于动物体内, 各自发挥着不同的功能, 对促进动物的生产性能和动物的健康等方面发挥着良好作用。温刘发等^[17]用抗菌肽代替抗生素饲喂断奶仔猪, 发现添加抗菌肽组仔猪腹泻率下降, 并且添加抗菌肽对仔猪增重无不良影响。

3.3 粪便的饲料化 随着我国养殖业的发展, 每年的畜禽粪便的排放量越来越大, 若直接排放到环境中势必会造成严重的污染。如能合理利用这些粪便, 将会大大减少有害气体的排放, 减少对大气的污染。畜禽粪便含有丰富的蛋白质、粗脂肪、B 族维生素、矿物质元素和一定数量的碳水化合物, 经过适当处理后可以调制成新的饲料^[18]。特别是鸡粪的营养丰富, 含有较高的蛋白质含量, 且氨基酸种类很齐全, 目前鸡粪已经成为最受关注的一种非常规饲料资源。此外, 猪粪、牛粪经适当处理也可饲料化, 获得较佳的饲喂效果。杜光波^[19]采用 5%~25% 肉鸭粪取代日粮中的麸皮饲喂生长期肉兔, 发现对家兔增重和屠宰率均无显著影响, 说明用肉鸭粪饲喂生长期肉兔是可行的。邱美珍等^[20]用含有 20% 的奶牛粪生物饲料的颗粒料分别替代部分麦麸和苜蓿草粉饲喂肉兔, 发现饲喂奶牛粪生物饲料组的家兔的增重、饲料报酬和经济效益优于对照组。总之, 通过将畜禽粪便饲料化, 不仅拓宽了饲料资源, 而且有效地减少了畜禽粪便对环境的污染。

4 小结

畜禽养殖业发展对环境造成的污染问题日益

突出, 处理好畜牧业与环境的协调发展已成为人们关注的一个重要问题。空气的质量与人类的健康息息相关, 了解空气污染物的特点和危害, 采取有效的措施控制和减少畜禽粪便排放量, 减少恶臭等有害气体对环境造成的污染, 对发展畜牧养殖业和改善生态环境有着重要的意义。

参考文献:

[1] 肖振铎. 解读“养殖业”对环境的污染与防范对策[J]. 吉林畜牧兽医, 2007, 28(9): 1-3.
 [2] 刘金荣. 畜牧生产的环境污染与综合治理对策[J]. 中国奶牛, 2004, (1): 12-14.
 [3] 崔令腾. 畜禽养殖场的污染现状及对策[J]. 山东畜牧兽医, 2007, 28(4): 13.
 [4] 何忠, 肖军. 畜禽养殖业污染综合研究[J]. 固原师专学报(自然科学), 2005, 26(6): 15-20.
 [5] 单计光, 谭支良, 汤少勋. 养殖业排泄物对环境的潜在影响与生态管理[J]. 重庆环境科学, 2003, 23(12): 90-98.
 [6] 张鹤平. 畜牧场恶臭及有害气体的危害及控制[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 2001, 18(1): 25.
 [7] 汪开英, 代小蓉. 畜禽场空气污染对人畜健康的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(10): 32-35.
 [8] 刘忠琛, 纪伟旭. 环境污染与生态饲料的配制及营养调控[J]. 江西饲料, 2003, (3): 1-4.

[9] 李伟跃. 采用营养调控降低营养素排放减少环境污染[J]. 养殖与饲料, 2006, (9): 14-16.
 [10] 秦长川, 李业福, 孙展和. 颗粒料和粉料饲喂生长肉兔的效果试验[J]. 山东农业科学, 2003, (1): 41.
 [11] 李维炯, 倪永珍, 黄宏坤, 等. 微生态制剂在生态畜牧业中应用效果[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(增刊): 85-92.
 [12] 王自恒, 林峰, 陈玉霞, 等. 环保型饲料添加剂的研究进展[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2005, 25(3): 171-173.
 [13] 张中, 王爱卿, 吴志国, 等. 饲用酶制剂对断奶仔猪生产性能的影响[J]. 饲料广角, 2008, (17): 27-28.
 [14] 李锋涛. 中草药饲料添加剂在养殖业中的应用进展[J]. 饲料添加剂, 2008, (3): 19-21.
 [15] 于辉, 廖洁丹, 尚秀国, 等. 中草药饲料添加剂对仙湖肉鸭生产性能和肠道微生物影响的研究[J]. 营养饲料, 2008, 15(44): 29-31.
 [16] 何河, 方热军, 高凤仙, 等. 蛋氨酸铜对猪血清铜锌含量及粪铜锌排泄量的影响[J]. 家畜生态学报, 2008, 3(29): 43-46.
 [17] 温刘发, 张常明, 付林, 等. 抗菌肽制剂代替抗生素在断奶仔猪饲料中的应用效果[J]. 中国饲料, 2001, (18): 13-14.
 [18] 李鹏, 王文杰. 我国非常规饲料资源的应用[J]. 饲料博览(技术版), 2009, (4): 33-34.
 [19] 杜光波. 肉鸭粪饲喂生长期肉兔实验[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2005, (2): 5-6.
 [20] 邱美珍, 杨俊, 任惠波, 等. 牛粪生物饲料对肉兔的饲养效果[J]. 饲料与饲养, 2008, (7): 19-20.



(上接第 8 页)

全高效的猪瘟活疫苗就非常必要。

中国兽医药品监察所和广东永顺生物制药有限公司经过 4 年多的联合研究, 利用猪瘟兔化弱毒接种传代细胞, 成功研制出新一代猪瘟弱毒疫苗——猪瘟活疫苗(传代细胞源)。此疫苗配苗用细胞毒液病毒含量 $\geq 5 \times 10^5$ RID/mL, 每头份疫苗病毒含量 $\geq 7\ 500$ RID。更为重要的是生产猪瘟传代细胞苗建立了细胞库, 细胞库内的传代细胞经过了严格鉴定, 保证细胞无 BVD/MDV 等外源病毒污染, 且细胞培养批间差小, 确保了疫苗质量的稳定。从而使我国猪瘟疫苗的质量标准到达和超过了国际标准, 实现了我国猪瘟疫苗质量的重大突破, 为我国猪瘟防治提供了有力的技术保障。该项技术成果于 2007 年申报国家知识产权发明专利。2008 年获得农业部批准, 由广东永顺生物制药有限公司组织生产, 并在广东、湖南、河南、四川、江苏、山东、辽宁和福建等 8 省(区)销售使用。

参考文献:

[1] 赵耘, 宁宜宝. 猪瘟疫苗研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(1): 39-42.

[2] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 282-288.
 [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[M]. 1992.
 [4] 丘惠深, 郎洪武, 王在时, 等. 猪瘟兔化弱毒疫苗与我国近年猪瘟野毒的免疫保护相关性试验[J]. 中国兽医杂志, 1997, 31(3): 1-3.
 [5] 孙建华, 陈礼传, 吴健敏, 等. 猪瘟病毒广西地方流行株 GX-3/98 的致病性及其与兔化弱毒株的免疫相关性[J]. 中国兽医学报, 2008, (5): 493-510.
 [6] 黄艳艳, 刘忠锋, 颜世敢. 猪瘟超前免疫法及其在国内的应用进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004, (1): 64-65.
 [7] 林太明. 猪瘟超前免疫要点[J]. 南方养猪, 2007, (3): 22-25.
 [8] 中国农科院哈尔滨兽研所. 家畜染病学[M]. 北京: 农业出版社, 1989. 428.
 [9] 马现伟. 陈启文. 仔猪猪瘟超前免疫及注意事项[J]. 湖北畜牧兽医, 2006, (1): 29.
 [10] 吴静. 猪瘟超前免疫注意事项[J]. 四川畜牧兽医, 2006, (4): 56-56.
 [11] 郭吉强, 高洪, 朱仲华, 等. 规模化猪场猪瘟免疫失败的原因探析及综合防控措施[J]. 2008, (5): 8-11.
 [12] 李毅, 郑仲金, 温富勇, 等. 猪瘟疫苗在猪瘟防治上的应用技术[J]. 中国畜禽种业, 2008, (10): 40-42.
 [13] 蔡宝祥. 当前我国猪瘟防治中存在的问题和对策[J]. 当代畜禽养殖业, 2003, (7): 3-6.
 [14] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 2005 年版. 北京: 中国农业出版社, 2006. 96-98.

抗母猪生殖应激剂和抗仔猪断奶应激剂对断奶仔猪血清乳酸脱氢酶同工酶的影响初探

陈琼¹, 廖三赛¹, 贺长青², 文利新², 傅童生²

(1. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南长沙 410127; 2. 湖南农业大学动科院, 湖南长沙 410128)

摘要: 选取18头大白经产母猪及其所产仔猪, 随机分为3组, 分别于断奶时和断奶后15 d时上午采血, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分析了血清中乳酸脱氢酶同工酶谱的分布特征, 结果如下: 与对照组相比, 在母猪料中添加了2%的抗母猪生殖应激剂和断奶仔猪料中添加了2%的抗仔猪断奶应激剂的试验1组仔猪在断奶时和断奶后15 d时血清中LDH1的活性均极显著增强($P < 0.01$), 试验1组和只有仔猪在断奶前后按其采食量的2%添加抗仔猪断奶应激剂的试验2组断奶后15 d时LDH3、LDH4、LDH5的Rf值都极显著减弱($P < 0.01$), 其他差异不显著。

关键词: 抗母猪生殖应激剂; 抗仔猪断奶应激剂; 断奶仔猪; 乳酸脱氢酶同工酶

中图分类号: S854.547

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0016-03

目前, 许多大型集约化猪场为提高生产效率和降低成本, 将断奶时间从过去传统仔猪10周龄提前到3~5周龄, 这种生产工业流程, 称为仔猪早期断奶(PEW)。然而, 由于早期断奶的仔猪离开母猪后, 在重新合群、高度密集、建立新的等级次序、生活在新的栏舍、饲料和营养的突然改变等不良因素的作用下, 引起仔猪应激, 导致仔猪早期断奶应激综合症(PWSD)。这种疾病由于其发生率和死亡率较高, 俗称“断奶关”, 给养猪业造成了重大损失^[1]。

现阶段, PWSD的防治已取得了大量研究成果, 在实践中应用也取得了一定效果。但是过去的研究主要集中在如何解决断奶仔猪腹泻问题上。另外在解决PWSD的问题上也缺乏系统、整体观念, 忽视了母猪的关键作用, 忽视了仔猪内因的影响。为此, 我们承担了湖南省农业科技计划项目《规模化养猪主要应激疾病关键防治技术研究及产品研制》(编号是01NKJ3014)课题研究, 研制了抗母猪生殖应激剂, 预防母猪生产繁殖应激, 提高仔猪初生重, 增加母猪泌乳的质和量, 提高仔猪抗病力和断奶重。再配合使用抗仔猪断奶应激剂, 以预防仔猪断奶应激引起的采食量下降、腹泻、掉膘和抗病力下降。为进一步研究该综合防治技术对仔猪早期断奶应激预防效果及其在机体内的作用机理特开展了本研究。

1 材料与方法

1.1 试验用药 ①抗母猪生殖应激剂的原料组成: 微量元素氨基酸螯合物、维生素、磷酸氢钙、乙氧基喹啉、稀释剂(麦饭石或沸石)、载体(糠粕)等, 每千克产品成分分析保证值见表1; ②抗仔猪断奶应激剂的原料组成: 微量元素氨基酸螯合物、氧化锌、维生素、磷酸氢钙、乙氧基喹啉、稀释剂(麦饭石或沸石)和载体(糠粕)等, 每千克产品成分分析保证值见表2。

表1 抗母猪生殖应激剂每千克产品成分分析保证值

成分	数量	成分	数量
蛋白质(g)	200	维生素B2(mg)	37.5
L赖氨酸(g)	100	烟酸(mg)	80
DL蛋氨酸(g)	15	泛酸(mg)	42.5
L苏氨酸(g)	15	叶酸(mg)	1.25
钙(g)	120-180	铁(mg)	3000
总磷(g)	45-80	铜(mg)	250
维生素A(万IU)	15	锌(mg)	2500
维生素D ₃ (万IU)	1	锰(mg)	100
维生素E(IU)	800	碘(mg)	7
维生素B1(mg)	5	硒(mg)	5

1.2 试猪与饲养管理 2008年9-10月, 本研究小组在湖南生物机电职业技术学院种猪场选取刚产仔的大白猪经产母猪18头, 母猪的平均窝产仔数是11头, 随机分成3组, 即试验1组、试验2组及对照组, 每组各6头母猪和66头初生仔猪。试

表2 抗仔猪断奶应激剂每千克产品成分分析保证值

成分	数量	成分	数量
蛋白质(g)	180	维生素E(IU)	500
L赖氨酸(g)	60	铁(mg)	1000
DL蛋氨酸(g)	30	铜(mg)	300
L苏氨酸(g)	20	锌(mg)	3000
钙(g)	40-80	锰(mg)	200
总磷(g)	10-30	碘(mg)	10
维生素A(万IU)	15	硒(mg)	5
维生素D ₃ (万IU)	1		

验1组母猪产仔前一个月和产仔后的饲料中按其采食量添加2%的抗母猪生殖应激剂,仔猪在其哺乳仔猪料和断奶仔猪料中按其采食量的2%添加抗仔猪断奶应激剂(添加剂量在文利新等^[2]、蒋政云等^[3]的试验报道中已经论证);试验2组仔猪断奶前后按其采食量的2%添加抗仔猪断奶应激剂,母猪饲料不作处理;对照组母猪饲喂母猪料,仔猪饲喂哺乳仔猪料和断奶仔猪料,不作任何处理。所有试验用仔猪28日龄断奶,断奶后原圈继续饲养。母猪和断奶仔猪均自由采食,人工添料,每天两次,饮水由饮水器供给。对所有试验用猪均进行详细的临床观察和记录。

1.3 血液样品采集和处理 前腔静脉采血,血液样品分别于断奶时、断奶后15天采取。每次采血7~8 mL/头,均在上午9:00~10:00进行。在室温(10℃左右)下自然凝固,分离血清,保存于4℃冰箱中,第二天9:00进行检验。

1.4 电泳与染色 采用李雅轩^[4]介绍的不连续电泳技术,略加修改。利用垂直玻璃管电泳分离LDH同工酶,分离胶浓度为7%。将血清用40%的蔗糖溶液按1:2稀释后,在凝胶表面点样50 μL后立即电泳。电泳缓冲液为Tris-Gly,pH为8.3。上槽中加入溴酚蓝10滴,用BS243型稳流稳压电泳仪(北京生化仪器厂)在4℃电泳,电压为300 V,电泳时间约为2 h。电泳结束后,采用赵晓平等^[5]介绍的方法进行染色,按喻梅辉^[6]等介绍的方法固定并画描。

1.5 电泳迁移率 用相对迁移率Rf表示,即同工酶区带泳动距离与溴酚蓝标线泳动距离之比,用百分数表示。

1.6 同工酶 分析根据同工酶区带数、Rf和着色强度进行综合分析。

1.7 数据统计处理 含重复处理的试验数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示,试验组与对照组间的对比分析采用

均数差异显著性检验,由EXCEL软件统计处理。

2 试验结果

2.1 断奶仔猪血清乳酸脱氢酶同工酶酶谱 本试验的对照组和试验组中断奶仔猪血清乳酸脱氢酶同工酶的特征图谱见图1。结果显示:所有试验仔猪断奶时和断奶后15 d,LDH同工酶均显示5条酶带,从阳极到阴极依次为LDH1、LDH2、LDH3、LDH4和LDH5,其中对照组仔猪断奶时和断奶后15 d时以LDH4、LDH5酶带最宽,着色最明显;试验1组断奶时以LDH1酶带最宽,着色最明显;断奶后15 d时以LDH1、LDH2酶带最宽,着色最明显。试验2组仔猪断奶时以LDH1、LDH2酶带最宽,着色最明显;断奶后15 d时以LDH1酶带最宽,着色最明显。

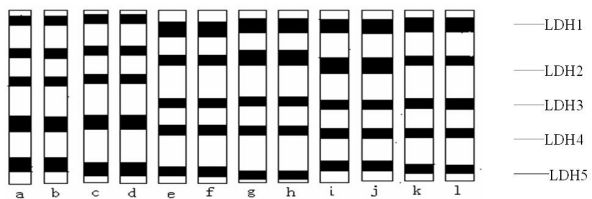


图1 断奶仔猪的血清乳酸脱氢酶同工酶图谱

注:ab为对照组仔猪断奶时,cd为对照组仔猪断奶后15d时,ef为试验1组仔猪断奶时,gh为试验1组仔猪断奶后15d时,ij为试验2组仔猪断奶时,kl为试验2组仔猪断奶后15d时。

2.2 两种抗应激剂对断奶仔猪血清LDH同工酶酶带泳动距离和Rf值的影响 结果分别见表3和表4。结果表明,与断奶时相比,试验1组仔猪断奶后15 d时血清中LDH1、LDH2酶带泳动速度和Rf值均极显著增加,试验2组仔猪断奶后15 d时血清中LDH1、LDH2酶带泳动速度极显著增加,LDH2的Rf值极显著增加;与对照组同期相比,试验1组仔猪断奶时和断奶后15 d时血清中LDH1酶带泳动速度均极显著地增加,试验1组和试验2组断奶后15 d时LDH3、LDH4、LDH5的Rf值极显著减弱,其他差异不显著。

3 分析与讨论

3.1 同工酶是基因表达的直接产物,对同工酶的分析可直接判断基因的表达规律,是基因的生化表现型。它对于探讨生物进化、种间亲缘关系、分子遗传、个体发育和细胞分化中基因表达都具有十分重要的意义。LDH同工酶是由A、B两个亚基组成的四聚体,A、B两亚基分别受同一位点不同的两基因控制,分别称为Ldh-A和Ldh-B基因,这

表 3 两种抗应激剂对断奶仔猪血清 LDH 同工酶电泳泳动距离的影响

组别		LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5
试验 1 组	断奶时	5.29±0.41 ^(**1)	4.13±0.61	3.30±0.47	2.39±0.43	1.19±0.24
	断奶后 15d	5.93±0.62 ^{**/**}	4.96±0.61 ^{**/**}	3.63±0.44	2.55±0.25	1.02±0.44
试验 2 组	断奶时	4.64±0.44	3.67±0.39	2.70±0.31	1.98±0.26	1.29±0.19
	断奶后 15d	5.47±0.29 ^{**/**}	4.54±0.29 ^{**/**}	3.23±0.34 ^{**/**}	2.26±0.28 ^{**/**}	1.71±2.25
对照组	断奶时	4.75±0.26	3.94±0.46	3.05±0.20	2.14±0.34	1.29±0.40
	断奶后 15d	5.32±0.40	4.57±0.53 ^{**/**}	3.51±0.37 ^{**/**}	2.51±0.37 ^{**/**}	1.13±0.32

单位:cm

1):*/表示该值与同组仔猪断奶时相比差异显著($P < 0.05$);**/表示该值与同组仔猪断奶时相比差异极显著($P < 0.01$);/*表示该值与对照组同期相比差异显著($P < 0.05$);/**表示该值与对照组同期相比差异极显著($P < 0.01$)。下同。

表 4 两种抗应激剂对断奶仔猪血清 LDH 同工酶的 Rf 值的影响

组别		LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5
试验 1 组	断奶时	0.93±0.05	0.72±0.05	0.58±0.04 ^(*1)	0.42±0.07	0.21±0.05 ^{**}
	断奶后 15d	0.96±0.01 ^{**/**}	0.82±0.02 ^{**/**}	0.60±0.02 ^{**/**}	0.42±0.01 ^{**/**}	0.17±0.07 ^{**/**}
试验 2 组	断奶时	0.96±0.02	0.75±0.02	0.55±0.02	0.40±0.03	0.28±0.03
	断奶后 15d	0.96±0.01 ^{**/**}	0.81±0.03 ^{**/**}	0.58±0.03 ^{**/**}	0.40±0.03 ^{**/**}	0.21±0.02 ^{**/**}
对照组	断奶时	0.96±0.02	0.75±0.02	0.55±0.02	0.40±0.03	0.28±0.03
	断奶后 15d	0.98±0.01	0.82±0.02	0.63±0.03 ^{**/**}	0.44±0.02 ^{**/**}	0.27±0.01

单位:cm

两个基因所表达的 A、B 两亚基表现型为 LDH1、LDH2、LDH3、LDH4、LDH5, 分别相当于 B4、B3A1、B2A2、B1A3、A4 五个基因型。LDH 基因的表达是受遗传基因和代谢物的双重控制。因此, LDH 同工酶位点上某个基因表达活性在同一个个体的不同器官和脏器, 或幼年和成年时期, 或品系之间都可以有明显的差异。本试验中 LDH 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果显示: 所有试验仔猪断奶时和断奶后 15 d 时血清 LDH 同工酶均显示 5 条酶带, 从阳极到阴极依次为 LDH1、LDH2、LDH3、LDH4 和 LDH5。詹新贵等^[7]在猪组织中乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定中报道猪的肺、脾组织中均显示 5 条酶带, 肝组织中显示 4 条酶带, 心组织中只分离出 3 条酶带, 说明 LDH 同工酶具有明显的组织特异性。

3.2 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶是参与糖代谢的重要的酶, 其中 LDH4、LDH5 主要催化丙酮酸转化成乳酸, 是与糖酵解有关的酶。而 LDH1 和 LDH2 催化乳酸氧化成丙酮酸进入三羧循环, 是与糖有氧代谢有关的酶, 所以 LDH 同工酶各区带含量的变化趋势直接反映糖代谢的方式和水平的变化^[8]。本试验中, 与对照组相比, 试验组血清中 LDH1 和 LDH2 活性加强, LDH4 和 LDH5 活性减弱, 说明添加抗母猪生殖应激剂和抗仔猪断奶应激剂, 能抑制

糖酵解反应, 加快糖的氧化分解反应, 能获得更多的能量, 以满足机体内各项生理功能的需求, 进一步增强断奶仔猪的新陈代谢机能, 增强体质, 达到了防治仔猪断奶应激反应的目的。

参考文献:

- [1] Armstrong W D, Clawson A J. Nutrition and management of early weaned pigs. Effect of increased nutrient concentration and/or supplemental liquid feeding[J]. J Anim Sci, 1980, (50):377-384.
- [2] 文利新, 袁慧, 谢岚, 等. 运用“护仔康 1 号”预防断奶仔猪应激[J]. 湖南农业大学学报(自然科学), 2003, (29):194-195.
- [3] 蒋政云, 范运生, 岳腊梅. 性命 1 号与护仔康 1 号联合应用效果观察[J]. 湖南农业大学学报(自然科学), 2003, (29):189-190.
- [4] 李雅轩, 赵昕. 遗传综合实验[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 2006. 85-89.
- [5] 赵晓平, 荣威恒, 刘晓光. 家鸽不同组织同工酶的初步研究[J]. 四川动物, 2008, 27(6):1017-1020.
- [6] 喻梅辉. 家畜血清中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的分离与测定[J]. 中国兽医杂志, 1983, 9(12):7-9.
- [7] 詹新贵. 猪组织中乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定[J]. 湖南农业大学学报, 2003, 29(5):426-427.
- [8] 方丁. 同工酶在医学上的应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982, (1):22-56.

娟姗牛在广西的繁殖性能初报

刘瑞鑫, 吴柱月*, 黄 迺, 磨考诗

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001)

中图分类号: S823.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0019-02

娟姗牛原产于英国的娟姗岛, 是一种小型的乳用品种, 具有耐热、耐应激和耐粗饲的特点, 以乳脂率和蛋白率高、乳房形状良好而闻名。2004年底, 本所从新西兰引进纯种娟姗育成牛 100 头, 在珠海隔离 3 个月, 于 2005 年 2 月 26 日正式引入 99 头。目前, 这批娟姗牛已全部投产, 引入后所产的后代也陆续投产。经过这几年的饲养观察, 娟姗牛已完全适应了广西高湿高热的环境, 其优良的繁殖性能也逐渐体现。本文结合我们这几年的观察及记录, 就娟姗牛在广西区的繁殖性能作一初报, 以更好更详细地了解该品种, 为大力推广提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 供试牛群 广西畜牧研究所 2005 年从新西兰引进的纯种娟姗牛及部分自繁娟姗牛。

1.2 数据表示 所有试验数据均采用平均数(\bar{X})±标准差(S)表示。

2 娟姗牛繁殖性能情况

2.1 犊牛初生重 根据我们对 94 头初生公犊和 102 头初生母犊的统计表明, 娟姗初生重公犊为 23.76±3.64 kg, 母犊为 21.54±3.33 kg, 公、母犊初生重差别不大。初生重范围公犊为 15~40 kg, 母犊为 12.5~30.5 kg, 娟姗犊牛个体明显小于荷斯坦犊牛。

2.2 娟姗牛繁殖性能 从表 1 可以看出, 引进的

纯种娟姗牛的初配月龄平均为 18.5 月, 我们自繁的娟姗牛初配月龄平均为 16.4 月, 提前 2 个月左右; 纯种娟姗牛初产月龄为 28 月龄, 我们自繁的娟姗牛 26 月龄左右就可产犊。娟姗母牛怀公犊的妊娠期为 277.2±5.8 天, 怀母犊的妊娠期为 275.8±5.4 天, 怀公、母犊的妊娠期相差不大; 产犊间隔平均为 361.9 天。对 56 头娟姗母牛 100 胎次的统计表明, 产后第一次发情时间平均为 41.8 天。对 42 头娟姗母牛 104 个发情周期的统计发现, 娟姗牛发情周期平均为 20.4 天。

从表 2 可以看出, 第 1 情期受胎率, 青年牛较低, 为 58%, 经产牛为 63.6%; 总情期受胎率, 青年牛为 65.3%, 经产牛为 57%, 也是比较低。根据我们的统计, 娟姗牛的繁殖率为 78.2%, 有些偏低; 犊牛成活率为 92.6%, 母牛难产率 2%。据对 84 头 237 胎次的统计结果表明, 平均每受胎一次需消耗冻精 1.2 支, 发情时排卵优势卵泡出现在右卵巢的比率为 53.5%, 高于左卵巢的 46.5%。

3 分析与小结

有资料^[1-3]表明, 娟姗牛具有较高的繁殖性能, 主要表现在性成熟早、难产率低(仅为 2.2%)和受胎率高。根据我们的统计发现, 引进后的纯种娟姗牛的初配月龄平均为 18.5 月, 未能体现其性成熟早的特点。这是由于在引入本所前该批娟姗牛已在珠海隔离 3 个月, 而此时该批娟姗牛已到 15 月

表 1 娟姗牛繁殖性能情况

项 目	初配月龄(月)		初产月龄 (月)	妊娠期(天)		产犊间隔 (天)	产后第一次发 情时间(天)	发情周期 (天)
	纯种	自繁		公犊	母犊			
统计数	94头	21头	50头	81头	97头	72胎次	56头/100胎次	42头/104个
平均数(\bar{X})	18.5	16.4	28	277.2	275.8	361.9	41.8	20.4
标准差(S)	1.6	1.6	1.3	5.8	5.4	44.9	13.5	1.8

收稿日期: 2009-06-10

*: 通讯作者

表2 娟姗牛繁殖性能情况

项 目	娟 姗 牛	
第1情期受胎率(%)	青年牛	58
	经产牛	63.6
总情期受胎率(%)	青年牛	65.3
	经产牛	57
繁殖率(%)		78.2
犊牛成活率(%)		92.6
难产率(%)		2
每受胎一次消耗冻精数(支/胎)		1.2
发情时卵泡出现在	左	46.5
	右	53.5
左、右卵巢的比率(%)		

龄左右,且在隔离期间,料、草缺乏,导致营养不足,膘情普遍比较低下。引入本所后,再经过适应饲养、催肥、配种,初配月龄相应延后。据报道^[3],娟姗牛在广州的初配月龄为14月龄,而我们自繁的娟姗牛初配月龄平均为16.4月龄,较纯种提前2个月。根据我们这几年的观察发现,娟姗牛在6-8月龄时即可出现初情期,14-15月龄时体重就可达到成年体重的70%时进行配种,可在24月龄左右投产,比荷斯坦牛提前2~4个月,说明娟姗牛比荷斯坦牛性成熟早。一般情况下,娟姗牛第一胎产犊时间为24~25月龄,且99%都可以自然分娩,后代犊牛的成活率98%以上。人工授精妊娠率较高,加拿大娟姗牛协会的统计资料表明,人工授精后56天不返情率为68%,比荷斯坦高7%。根据我们的统计,娟姗牛在广西的繁殖率为78.2%,低于广州的87%,也低于荷斯坦牛的82%^[3];犊牛成活率92.6%,优于荷斯坦牛的90%,大大高于广州的82%;难产率2%,低于相关资料的报道^[1,3]。在受胎率方面,由于我们引入纯种娟姗牛后,大规模应用超数排卵—胚胎移植技术进行扩繁,导致该批纯种娟姗牛投入生产的受胎率普遍较低。据我们后来的统计,自繁的娟姗牛其第1情期受胎率在75%以上,广州奶牛研究所的受胎率为91.4%^[3]。南宁的气候与广州相近,娟姗牛在广西的受胎率也应该达到这个水平。美国娟姗牛协会一项研究表明,娟姗牛的产犊间隔比荷斯坦牛减少18天,空怀天数减少18天。据统计,娟姗牛在广西的产犊间隔平均为361.9天,明显短于广州的399天^[3],也显著短于荷斯坦牛的421天。产后第一次发情时间41.8天,与荷斯坦牛相近。此外,我们还发现,娟姗牛发情后,排卵优势卵泡出现在右卵巢的

机率为53.5%,高于左卵巢的46.5%。有资料表明,水牛排卵的机率也是右卵巢居多^[4],这提示我们今后在配种时,输精可适当向右子宫角倾斜,以提高受胎率。

资料还表明,娟姗牛极少发生繁殖疾病,因繁殖原因的淘汰率仅为1.7%左右,低于荷斯坦牛的3%^[1,3]。从我们的观察来看,娟姗牛在广西已初步展现出其优良的繁殖性能,如犊牛成活率高、难产少、每受胎一次耗精数较少等。此外其优良的乳用性能(乳脂率、蛋白率高,口感好)、抗逆性和耐热性等也逐渐表现出来。根据我们这几年的观察,在夏季炎热时分,当荷斯坦牛在降温条件下还不停流涎的时候,娟姗牛仍可以不用降温设施。此外,娟姗牛在常见的乳房炎、肢蹄病、流行热等奶牛三大疾病的发病率上明显少于荷斯坦牛。由于娟姗牛乳脂率高、蛋白率高,耐热、抗逆性强,在我区可利用其精液杂交荷斯坦牛,也可杂交改良本地黄牛,繁殖和培育娟姗牛与黄牛高代杂种后代,增加我区奶牛数量。高海霞等^[5]报道,娟荷杂一代不仅表现出较好的抗热和抗病性能,而且其生产性能高于其母亲同胎次生产性能,头胎次305d,平均产奶量达5745kg。汪翔等^[1]的试验也表明,娟荷杂交牛的产奶量和荷斯坦牛的产奶量差异不大,娟杂一代相比荷斯坦母本群体,乳脂率提高了8.8%,蛋白率提高了20%,显示出通过娟姗牛杂交荷斯坦牛所带来的巨大经济效益。

根据我们的观察并综合相关资料,我们认为娟姗牛是比较适合在我区大力推广,可利用其杂交改良荷斯坦牛和广西的本地黄牛,也可大力发展娟姗牛产业,使其成为奶水牛之外广西奶业发展的又一新亮点。

参考文献:

- [1] 汪翔. 娟姗牛——一个对荷斯坦牛提出挑战的奶牛品种[J]. 中国畜禽种业, 2005, (10): 25-27.
- [2] 张明军, 郝海生, 朱化彬, 等. 娟姗牛——我国奶业生产重要的品种遗传资源[J]. 中国奶牛, 2008, (1): 11-14.
- [3] 汪翔, 关伟昆, 谢仕荣. 娟姗牛引进繁育试验初报[C]. 第二届中国奶牛发展大会报告暨论文集, 2006. 499-503.
- [4] 广西大学动物繁殖研究室. 王丕建论文集[M]. 第1版. 南宁: 广西科学技术出版社, 1996. 129-132
- [5] 高海霞, 徐凡标, 连艳红, 等. 对娟姗牛×荷斯坦牛的F1母牛在高温高湿地区的适应性观察[J]. 中国奶牛, 2006, (2): 24-27.

犊牛大肠杆菌病的诊治报告

黄伟明¹, 张国军², 林先¹, 徐芳芳¹

(1. 梅县动物卫生监督所, 广东 梅县 514700; 2. 梅县城东镇畜牧兽医水产站, 广东 梅县 514743)

中图分类号: S852.61*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0021-01

犊牛大肠杆菌病, 又称犊牛腹泻败血症, 是犊牛多发的一种急性传染病, 由致病性大肠杆菌引起, 以急剧腹泻和虚脱为主要特征^[1]。本病与犊牛发育尚未完善、正常生理机能较弱有关, 可引起犊牛死亡或发育不良。现将一起犊牛大肠杆菌病的诊治报告如下。

1 发病情况

2009年2月下旬, 我县某牛场发现9头犊牛(5~20日龄)不吃奶, 精神不振, 发热, 拉黄灰色粥样粪便。曾用磺胺脒和碳酸氢钠片逐头灌服, 肌注庆大霉素和安乃近。3天后, 仍未见好转, 其间共死亡了2头犊牛, 便向我所求诊。

2 临床症状

7头病犊表现为精神沉郁、食欲不振、体温升高(39.5~40.2℃), 持续拉水样、灰白色粪便, 混有凝血及泡沫, 有酸败气味, 频频努责, 后躯及后肢被粪便污染。

3 病理变化

对死亡的犊牛进行剖检, 发现肝肿大出血点, 胆汁黏稠呈暗绿色, 肾苍白, 心内膜有出血点, 肠系膜淋巴结肿大, 肠黏膜出血、变薄, 皱胃有大量凝乳块、胃底黏膜出血。

4 实验室诊断

4.1 病原的分离培养 无菌操作采取死亡犊牛的肝和小肠黏膜, 分别接种于鲜血琼脂平板和麦康凯琼脂平板, 经37℃培养24h后, 鲜血琼脂平板上生长出针头大小、灰白色、半透明的S型菌落; 在麦康凯平板上生长出针头大小、玫瑰红色的S型菌落。挑取菌落涂片染色镜检, 可见两端钝圆的革兰氏阴性小杆菌。

4.2 生化试验 该菌可发酵葡萄糖、乳糖、甘露醇, 产酸产气, 甲基红试验阳性, V-P试验阴性, 不产生硫化氢。

4.3 药敏试验 对分离菌按常规纸片法进行药

敏试验, 结果表明, 该菌对头孢噻肟和头孢拉啶高度敏感, 对丁胺卡那、氧氟沙星、诺氟沙星中度敏感, 对氨苄青霉素、庆大霉素、复合磺胺不敏感。

根据临床症状、病理变化和实验室检验结果, 诊断本病例为犊牛大肠杆菌病。

5 防治措施

①搞好环境卫生, 对全场进行清洁消毒。坚持每天消毒栏舍1次, 不留死角。②隔离病犊牛, 对症进行补液、消炎、解热、解毒^[2]。具体做法是: 连续4天, 每天上午每头静注5%葡萄糖氯化钠注射液500 mL, 其中250 mL按剂量加入头孢噻肟和丁胺卡那、地塞米松, 另250 mL加入V_{B1}和V_C; 5%碳酸氢钠200 mL。下午则每头静注50%葡萄糖200 mL, 连用4天。对体温升高的病犊, 肌注安乃近。③饮水中加入水溶性电解多维自由饮用, 连用4天。

通过采取以上措施, 7头犊牛的病情逐日好转, 用药后第5天, 7头犊牛都得到了康复。

6 小结与讨论

6.1 由于本病发病急, 传染快, 发病后应立即隔离犊牛进行治疗, 严格消毒, 防止病情蔓延、扩散。

6.2 大肠杆菌是家畜肠道里的常在菌, 广泛地存在于被粪便污染的地面、饮水、饲料和用具中。犊牛随着吃奶、喂食经消化道感染, 当机体抵抗力下降, 环境条件骤变时, 大肠杆菌成为致病菌, 引起犊牛急剧发病^[1]。因此, 避免应激, 加强对母畜、幼畜的饲养管理, 提供清洁干燥的产犊设备, 加强畜舍卫生和消毒工作对防治本病是非常重要的。大肠杆菌容易产生耐药性, 应该根据分离菌的药敏试验结果, 选用敏感药物进行治疗。

6.3 有关试验表明, 怀孕母牛在产犊前30~40天接种大肠杆菌菌苗, 2周后重复1次, 可使犊牛获得高水平的母源抗体, 达到理想的免疫效果。此外, 对刚出生母源抗体低的犊牛注射大肠杆菌基因工程苗或口服免疫血清也能有效预防本病。

几种常用激素在母牛繁殖中的使用方法探讨

欧聚寿¹, 李 铭^{2*}, 唐 莉³, 罗蒙和², 王启芝²

(1. 广西平乐县阳安乡水产畜牧兽医站, 广西 桂林 542407; 2. 广西畜牧研究所, 广西 南宁 530001; 3. 广西平乐县动物疫病防控中心, 广西 桂林 542400)

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0022-02

近年来,随着养牛业向着规模化、集约化和商品化不断发展,在母牛繁殖中越来越多地使用外源激素来提高母牛的生产性能,达到增加产量和提高质量的目的。笔者一直从事牛繁殖技术的研究和推广工作,需要经常使用几种常用的外源激素,现将我们多年来对几种常用激素的使用方法报告如下。

1 主要生殖激素的来源及生理功能

直接作用于生理生殖活动,并以调节生殖过程为主要生理功能的激素称“生殖激素”。生殖激素的种类很多,按产生部位和调节的关系分为5类:神经激素(下丘脑、松果腺激素)、垂体(前叶)激素、性腺(卵巢、睾丸)激素、胎盘激素和前列腺素(局部激素)。

1.1 下丘脑神经激素 下丘脑神经激素的种类很多,与牛繁殖密切相关的有两种:

1.1.1 促性腺激素释放激素 (GnRH) 来源于下丘脑的神经内分泌细胞。其主要生理作用:(1)生理剂量条件下,可促进促黄体素(LH)和促卵泡素(FSH)的合成和释放;(2)大剂量长时间使用,会产生抑制排卵、妨碍附植和妊娠等副作用。

1.1.2 催产素(OXT) 由下丘脑特定的细胞核团分泌合成。其主要生理功能:(1)促进精子在母牛生殖道内运行和分娩;(2)刺激乳腺导管肌上皮细胞收缩,引起母牛排乳。

1.2 垂体促性腺激素 垂体位于脑的底部,牛的垂体只有黄豆大小,分前后两叶。促性腺激素主要有3种,都是由垂体前叶分泌的。

1.2.1 促卵泡素(FSH) 由垂体前叶促性腺细胞产生。主要生理功能:促进卵泡细胞的分裂和卵泡的生长发育;促进卵泡合成雌激素,刺激母牛的发情表现;大剂量可增加发育卵泡的数量,引起超数排卵。

1.2.2 促黄体素(LH) 由垂体前叶促性腺细胞分泌。其主要生理功能:对母牛与FSH协同,促进卵泡的生长、成熟,进一步引起排卵、黄体形成;维持黄体存在和分泌孕激素,维持黄体功能和妊娠生理状态。

1.3 性腺激素

1.3.1 雌激素 由母牛卵巢的上卵泡颗粒细胞产生。其生理功能是:(1)维持母牛生殖道的形态和功能;(2)诱发发情表现和发情行为;(3)促进母牛第二性征和乳腺腺管的发育;(4)促进脂肪的合成;(5)反馈调节下丘脑和垂体前叶LHG的分泌活动。其商品制剂为已烯雌酚、二丙酸雌二醇、苯甲酸雌二醇和戊酸雌二醇等。

1.3.2 孕激素 由母牛卵巢黄体 and 胎盘产生。主要生理功能是:(1)促进妊娠期间子宫和胎盘的发育和增生,维持和保护妊娠;(2)抑制发情;(3)促进乳腺腺泡的发育;(4)促进母牛的合成代谢;(5)反馈抑制下丘脑和垂体前叶FSH的分泌活动。其商品制剂为CIDR。

1.4 胎盘激素

1.4.1 孕马血清促性腺激素(PMSG) 由妊娠马属动物子宫内膜杯状细胞产生。PMSG具有FSH和LH的双重生理作用,但以FSH的作用为主,其商品制剂为FSH的廉价代用品。

1.4.2 人类绒毛膜促性腺激素(HCG) 由人及灵长类胎盘绒毛膜合体层产生,妇女怀孕1.5~4个月间出现于尿中,孕妇该阶段的尿液及刮宫废弃物是提取HCG的原料。HCG的生理作用与LH相似,其商品制剂是LH的廉价代用品。

1.5 前列腺素 局部激素主要是前列腺素(PG),广泛存在于机体的各种组织。前列腺素的种类很多,与牛繁殖关系最密切的是前列腺素F2a

(PGF_{2a})。主要生理功能表现在两个方面:(1)促使功能黄体退化;(2)促进平滑肌的收缩,与母牛的排卵、配子和胚胎的运行有重要关系。

2 几种常用激素的使用方法

2.1 胚胎移植中供体牛的超数排卵 基本使用CIDR+FSH+PG超排方法。在此基础上,我们还做了改进的超排方法:CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃和PMSG预处理+LHRH-A₃+CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃法的试验研究,得到的结果是:CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃方法的头均可用胚胎数比CIDR+FSH+PG方法的高出1.5枚左右,说明CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃方法比CIDR+FSH+PG方法的效果好^[1]。使用CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃方法与PMSG预处理+LHRH-A₃+FSH+PG+LHRH-A₃方法超排效果相比,PMSG预处理+LHRH-A₃+CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃方法比CIDR+FSH+PG+LHRH-A₃的方法效果好。

2.2 母牛同期发情 牛场在生产中,为了选择合理季节集中产犊以方便管理,以及用于开展胚胎移植的受体牛,通常使用激素达到同期发情的目的。

2.2.1 两次PG注射法 在母牛性周期的任意一天,第一次肌注PG 0.6 mg/头,11天后第二次肌注PG 0.6 mg/头。在第二次肌注PG后的24~72 h要对受体牛作上午7:30和晚上8:00两次发情观察,这种方法的同期发情率平均达到73%以上^[2]。

2.2.2 CIDR+PG法 在母牛性周期的任意一天,埋入CIDR的当天为第0天,到第9天肌注PG 0.6 mg/头,第11天上午取出CIDR,第12天和第13天观察母牛的发情情况,受体牛的同期发情率平均达到87%以上^[2]。这种方法主要用于胚胎移植受体牛的同期发情。

2.2.3 PG+PMSG法 在母牛性周期的任意一天,第一次肌注PG 0.6 mg/头,48 h后肌注PMSG 300~700 IU/头不等(根据母牛的体重而定)。这种方法主要用于母牛的人工输精工作中。采用这种处理方法,比单独使用PG肌注法可提高同期发情率和受胎率。

2.2.4 CIDR+PMSG+PG法 在母牛性周期的任意一天,埋入CIDR的当天为第0天,到第7天肌注PMSG 500 IU/头,第9天肌注PG 0.6 mg/头,第10天上午取出CIDR,第12天和第13天观察受体牛的发情情况。这种方法主要用于胚胎移植受体牛的同期发情,同期发情率可以达到98%以上。

2.2.5 CIDR+PMSG+PG+LHRH-A₃法 本方法与第2.2.4相似,在母牛发情后肌注LHRH-A₃ 50~75 μg/头,可以促使发情母牛卵子成熟及排卵。胚胎移植受体牛的移植率可以达到100%。

2.3 利用激素治疗母牛卵巢疾病 卵巢疾病主要为卵巢囊肿、卵巢持久黄体、卵巢静止等,通过使用激素治疗能促进奶牛的正常发情。

2.3.1 PG+LHRH-A₃法 适用于卵巢黄体囊肿和卵巢持久黄体的治疗。肌肉注射PG 0.6 mg/头,24~72 h内观察到发情的,通过外观观察黏液和直肠检查卵泡发育情况,确定给奶牛配种时间,配种后1 h内肌肉注射LHRH-A₃ 50~75 μg/头。

2.3.2 FSH+PG+LHRH-A₃法 适用卵巢囊肿、卵巢静止和卵巢持久黄体的治疗。FSH的使用量,分国产和进口两种,视奶牛体况,国产的使用3~5 mg,进口的使用120~200 mg,分3天做递减肌肉注射,在注射FSH的第2天同时注射PG 0.6 mg/头。注射完FSH的48 h内仔细观察发情情况,有发情的检查卵泡发育情况,确定奶牛配种时间,配种后肌注LHRH-A₃的量与2.3.1相同。

2.3.3 PMSG+LHRH-A₃法 适用于持久黄体和卵泡囊肿的治疗。PMSG用量500~1 000 IU/头,待母牛发情后,肌注LHRH-A₃法50~75 μg/头不等。

2.3.4 乙烯雌酚或PG单独使用 均可治疗母牛的持久黄体。乙烯雌酚15~20 mL,一次肌注,隔15~20天再复注一次;PG一次使用PG 0.6 mg/头。

2.3.5 HCG、LH或黄体酮(孕激素)单独使用 均可治疗母牛卵巢囊肿。HCG一次肌注10 000 IU;LH一次肌注200~400 IU,隔日一次,连续2~3次;黄体酮一次肌注50~100 mg,每日或隔日一次,连续使用2~7次,病复发者可以重复使用。

以上3种激素联合使用比单独使用的方法对治疗母牛卵巢疾病,促进正常发情的效果要好。

2.4 其它方面的应用

2.4.1 PG+催产素(OXT) 可以治疗母牛的难产。在母牛难产时,先肌注或从子宫颈放入PG 0.6~1.2 mg/头,约20 min后肌注OXT 30~50 IU。PG具有扩张子宫颈和促进子宫的收缩,与OXT同时使用有协同作用。

2.4.2 乙烯雌酚+PG或单独使用 均可治疗母牛的子宫内膜炎。因为这两种激素均能使子宫颈

(下转第34页)

做好山区农村高致病性禽流感防控工作的主要对策

宋玉胜

(广东省五华县畜牧兽医局, 广东 梅州 514400)

中图分类号: S851.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0024-01

高致病性禽流感是严重危害养殖业的烈性传染病。一旦发生疫情,不仅对畜牧业造成毁灭性的打击,还严重影响社会经济和公共卫生安全。禽流感防控重点在基层,难点在农村。笔者就对山区农村如何做好高致病性禽流感防控工作浅谈几点看法。

1 影响防控工作的四大因素

1.1 传统落后的养禽方式 大多数农民饲养家禽存在人禽混居、畜禽混养的不良状况,鸡粪、苍蝇到处都是,卫生条件极差,非常容易使病原体在人、禽、畜之间互相传播,毒力不断增强,存在发生疫情的隐患。

1.2 农民防疫意识淡薄 农村山区,有知识、有文化的年轻人大多外出打工,在家的成年人基本上是一些上了年纪的老人。他们文化素质不高,普遍对高致病性禽流感的危害性认识不足,认为死几只鸡、鸭、鹅无所谓,损失不大,不心疼。因此,他们认为打不打防疫针无所谓;有些人认为鸡打过一次防疫针后,就不会得病死了,如果鸡死了,就认为打防疫针不起作用,也不愿再打防疫针了;还有些人存在侥幸心理,认为解放前从没打过防疫针,鸡也照样不会死光。

1.3 基层动物防疫人员少,素质不高 由于从事畜牧兽医工作社会地位低,人才难进;待遇不高,人才难留。山区每个基层畜牧兽医站普遍只有2~3人,并且年纪偏大、素质偏低,基层动物防疫队伍出现断层、知识老化现象。加上农村自然条件复杂,工作量大,给防疫工作带来一定难度。同时,一些防疫员业务不精,技术欠妥,造成鸡只免疫接种后出现个别死亡,于是引起农户非常不满,甚至以后不配合免疫或抗注。

1.4 防控经费不足 一些山区贫困县,财政十分困难,防疫经费很难足额落实到位,即使有疫苗,

也没人工注射经费。村级防治员无工资或补贴,导致免疫工作难以落实。此外,由于监测经费不足,存在监测面窄、数量少的情况。

2 做好防控工作的主要对策

2.1 提高认识,加强领导,落实责任 做好农村高致病性禽流感防控工作,镇政府是领导主体。因此,各镇政府要高度重视,提高认识,切实加强组织领导,把100%的防控责任、免疫任务落实分解到镇、村干部和动物防疫员身上,效仿计划生育政策,实行“一票否决制”,确保防控工作有力有序开展。

2.2 推广科学的饲养管理方式 落后的饲养方式是导致高致病性禽流感传播的主要根源。因此,引导农民改变传统养殖模式和管理方式,推广科学先进的养禽技术,是预防高致病性禽流感的有效途径。广大畜牧兽医工作者应积极宣传人禽混居、畜禽混养的危害性,指导农民实行畜禽分养、家禽笼养或圈养,并做好清粪便和消毒工作,确保环境清洁卫生。同时,指导规模养禽场或养禽专业户建立完善的防疫、养殖和生产档案,实行标准化生产、封闭式管理,做到品种优良化、防疫程序化、产品绿色化、环境生态化。

2.3 加强宣传教育,提高农民防疫意识和守法意识 要充分利用电视广播、张贴标语、制作宣传栏和印发资料等方式,加大《动物防疫法》、《畜牧法》等法律法规的宣传力度,增强人民群众的防疫意识和法制观念,使他们能深刻认识禽流感的危害性,树立“防重于治,预防为主”的观念,变被动防疫为主动防疫,主动配合当地政府和畜牧兽医部门做好各项防控工作,做到能及时上报疫情,不食用病死畜禽。

(下转第37页)

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立

孔留五^{1,2}, 张桂红^{1*}, 姜增固², 康艳梅¹, 秦宏阳¹, 曹宗喜¹, 张得玉¹, 张翔峰¹
(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 广州市良种猪场, 广东 广州 510540)

摘要: 根据 GenBank 收录的 PRRSV 基因序列, 利用 PRRSV 经典变异株与缺失变异株 NSP2 基因序列特点, 设计合成两对特异性引物, 经 RT-PCR 扩增后, 用 T4 连接酶将目的片段与 pMD18-T 载体连接, 并转化到大肠杆菌 DH-5a 株感受态细胞。提取的质粒经 PCR、酶切和测序鉴定, 证实为 PRRSV 缺失变异株与经典变异株的阳性重组质粒。将重组标准质粒进行 10 倍系列稀释后作为模板, 通过实时荧光定量 PCR 法 (Real-time PCR), 建立了 PRRSV 缺失变异株与经典变异株的标准曲线及其直线回归方程, 并确定其最佳读板温度。该方法具有线性关系好、特异性强、敏感性高、重复性好等特点, 为鉴别诊断及分析 PRRSV 缺失变异株与经典变异株感染猪体内病毒的绝对含量提供了技术手段。

关键词: PRRSV; 实时荧光定量; 鉴别诊断; 绝对含量

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0025-05

Real-time RT-PCR assay for detection and differentiation of classical and mutational PRRS virus of Northern American type

Kong Liuwu^{1,2}, Zhang Guihong¹, Jiang Zenggu², Kang Yanmei¹,

Qin Hongyang¹, Cao Zongxi¹, Zhang Deyu¹, Zhang Xiangfeng¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangzhou Breeding Farm, Guangzhou 510540, China)

Abstract: Two pairs of primers were designed and synthesized according to the nsp2 genes classical and mutational PRRS virus available in GenBank. A real-time quantitative reverse transcriptase PCR (QT-PCR) assay was established for the rapid detection, differentiation and quantitation of PRRS virus. The PCR product of the target gene was ligated with pMD18-T vector and transformed to competent cell E. Coli DH5 α . The purified plasmid was identified to be combinant positive plasmid of classical and mutational PRRS virus after restriction enzyme digestion and sequencing. The standard curve was established by detecting recombinant plasmids with different concentration. The results showed that the real time RT-PCR assay was specific, sensitive and repeatable. It provided one effective method for differentiating classical and mutational PRRS virus and detecting the virus load in pigs.

Key words: PRRSV; real-time RT-PCR; differentiation; virus load

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) 引起的以母猪繁殖障碍和仔猪及育肥猪呼吸道疾病为特征的病毒性疾病^[1~3]。自该病于 1987 年在美国报道以来,

已成为许多国家养猪生产的主要疫病之一。已有的研究表明, PRRSV 具有广泛变异的特点^[4,5]。

2006 年 5 月开始在我国一些省份暴发了一场因 PRRSV 引起的“高热”综合症, 发病猪的体温高于 41℃, 病猪食欲不振甚至废绝, 腹部、耳及

收稿日期: 2009-05-12

基金项目: 广东省自然科学基金 (5006678); 广东省科技计划项目 (2007A0203006)

*: 通讯作者

后驱发红, 发病率、死亡率都是前所未有的。该病传播迅速, 在短短的半年内几乎传遍了大半个中国, 特别是对养猪业比较发达的省份造成了巨大的经济损失。

对分离到的“高热”综合症的毒株进行了序列分析, 与以前毒株相比, Nsp2 基因的第 483 位和 535-563 位氨基酸发生缺失。GP5 基因相互之间也是高度同源, 与以前的毒株相比变异也比较大, 尤其是第 151 位氨基酸的改变被认为是与毒力增强有关^[6-7]。因此本研究利用利用 PRRSV 经典变异株 (CH-R 株) 与缺失变异株 (XH 株) NSP2 基因序列差异特点, 监测 PRRSV 的 Nsp2 的变异^[8], 从而建立的一个特异性鉴别诊断及定量分析病毒感染量的技术手段。

1 材料及方法

1.1 主要材料 PRRSV 经典变异株 (CH-R 株) 与经鉴定为缺失变异株 PRRSV GD-XH (Gene Bank 序列号: EU624117) 毒种由华南农业大学兽医学院禽病教研室保存、提供。

1.2 主要试剂及仪器 AMV 反转录酶, dNTP, TaqDNA 聚合酶, SYBR Green I for Real-time PCR 试剂盒 (上海开放科技发展有限公司), 质粒小量抽提纯化试剂盒 (上海华舜公司), pMD18-T 载体、PCR 扩增试剂等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。荧光定量 PCR 仪为 ABI PRISM 7500 型。

1.3 标准阳性质粒的构建

1.3.1 引物的设计与合成 利用 PRRSV 经典变异株与缺失变异株 NSP2 基因序列特点, 设计合成三对特异性引物。

构建质粒引物 F/R:

上游引物: 5'-TGGGCGACAATGTCCTAACGGTT-3'

下游引物: 5'-TTATTGGTCTAAGAGCCTCCTG-3'

预计扩增经典变异株大小为 1 121 bp、预计扩增缺失变异株大小为 1 035 bp

荧光定量 PCR 检测引物 P1/P2:

上游引物: 5'-GTTCTGCACCGGTAGAA-3'

下游引物: 5'-TGATGACACAGGTGCAGGGT-3'

预计扩增经典变异株大小为 213 bp、预计扩增缺失变异株大小为 126 bp

荧光定量 PCR 鉴别引物 p3/p4:

上游引物: 5'-AGCCGATGACACCTCTGA-3'

下游引物: 5'-GGATTCGCTTCTCCACC-3'

预计扩增经典变异株大小为 256 bp。以上引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.3.2 核酸的提取 按 Invitrogen 公司 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒的使用说明进行。提取 PRRSV 经典变异株 (CH-R 株) 与缺失变异株 (XH 株) 病毒 RNA, 反转录得到 cDNA, 以 cDNA 为模板、F/R 为引物, 进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.3.3 重组质粒的构建 回收扩增的目的 DNA 片段, 与 pMD18-T 载体连接后, 转化大肠杆菌 DH-5a 感受态细胞。经酶切、PCR、测序鉴定。鉴定正确的阳性重组质粒命名 pMD18-CHR、pMD18-XH。

1.4 荧光定量 PCR 方法的建立

1.4.1 工程菌的培养和质粒的提取 培养含 pMD18-CHR、pMD18-XH 的工程菌并提取质粒, 测定 D_{260} 值, 定量并稀释至 1.0×10^9 拷贝 / μ L, -20°C 保存, 用前稀释。

1.4.2 引物浓度的筛选 应用质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 作为检测样品, 将引物的浓度配成 2、5、10、15、20、30 μ mol/L, 采用矩阵法优选引物的最佳浓度。

1.4.3 循环条件的确定 对荧光定量 PCR 的循环条件及退火温度等进行优化, 为了获得荧光信号的最佳检测条件。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 条件的确定 扩增反应总体积为 25 μ L, 其中 Real-time PCR Premix 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 模板 2 μ L, 用灭菌 DEPC 水补足, 均匀混合。扩增条件为: 95°C 预变性 1 min; 95°C 变性 15 s, 58.5°C 退火 15 s, 72°C 延伸 20s, 83°C 检测荧光, 进行 40 个循环后进行熔解曲线分析, 由 95°C - 60°C 1 min, 60°C - 95°C 1 min-END。

1.4.5 荧光定量 PCR 的鉴别诊断特异性、可重复性和稳定性 以检测引物及鉴别引物对靶 DNA (PCV2、PRRSV 经典变异株 (CH-R 株)、PRRSV 缺失变异株 (XH 株)、SIV、PRV、PPV 及大肠杆菌 DNA 或 cDNA) 及空白对照进行荧光定量 PCR 试验, 检测本方法的特异性。分别重复 3 次, 检测模板 DNA 含量为 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 拷贝 / μ L 的样品, 评价本方法的重复性和稳定性。

1.4.6 荧光定量 PCR 与常规 PCR 检测方法灵敏度的比较 以经 10 倍系列稀释 ($1.0 \times 10^{10} \sim$

1.0×10^0 拷贝 / μL) 的标准质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 为模板, 分别以检测引物、鉴别引物为引物, 进行常规 PCR 检测, 进行常规 PCR 与荧光定量 PCR 检测, 比较两种检测方法的灵敏度。

1.4.7 荧光定量 PCR 的敏感性与标准曲线的建立 用含有目的片段的质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 作为标准品, 将其 10 倍系列稀释成 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 拷贝 / μL , 作为模板进行荧光定量 PCR, 建立 PRRSV 经典变异株与缺失变异株检测的标准曲线。PCR 结束后取 PCR 反应液用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。

2 结果

2.1 PRRSV 经典变异株与缺失变异株 NSP2 基因片段的克隆及阳性标准质粒的构建 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, PCR 产物大小与预期结果相符 (见图 1), 同时将重组质粒进行测序, 结果表明 NSP2 基因片段已经克隆入 T 载体。

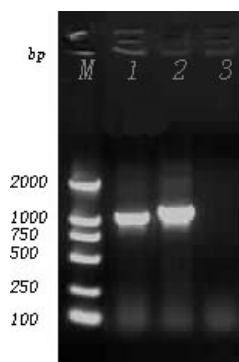


图 1 NSP2 基因 RT-PCR 扩增

M: DL2000 DNA Marker; 1: 缺失变异株 (XH 株) NSP2 基因扩增片段; 2: 非缺失变异株 (CH-R 株) NSP2 基因扩增片段; 3: 阴性对照

2.2 引物、探针浓度及循环条件的优化 采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。结果表明, 用 $15 \mu\text{mol/L}$ 的引物, 对质粒标准品的检测可获得较小的 Ct 值和较大的 ΔRn 。荧光定量 PCR 循环条件的优化结果表明, 双温循环及退火温度为 58.5°C 是最佳的循环条件。

2.3 荧光定量 PCR 鉴别诊断的特异性、灵敏度实验 为论证所建立荧光定量 PCR 检测方法的特异性, 以检测引物及鉴别引物对浓度为 1.0×10^8 拷贝 / μL 的 pMD18-CHR、pMD18-XH 质粒作模板进行实时荧光定量分析, 同时设定非靶 DNA (PCV2、SIV、PRV、PPV、及大肠杆菌 DNA 或 cDNA) 及空白对照。结果显示, 非靶模板及空白反应孔无

荧光响应, 缺失变异株对检测引物能产生荧光响应而对鉴别引物的荧光定量分析无荧光响应, 经典变异株对检测引物及鉴别引物均能产生荧光响应。表明本方法具有良好的鉴别诊断特异性 (图 2、3)。

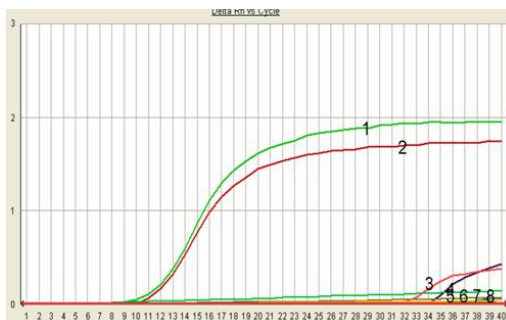


图 2 检测引物对缺失变异株和非缺失变异株的实时检测

1: pMD18-CHR 扩增曲线 2: pMD18-XH 扩增曲线; 3-7: PCV2、HCV、PRV、PPV、及大肠杆菌扩增曲线; 8: 阴性对照

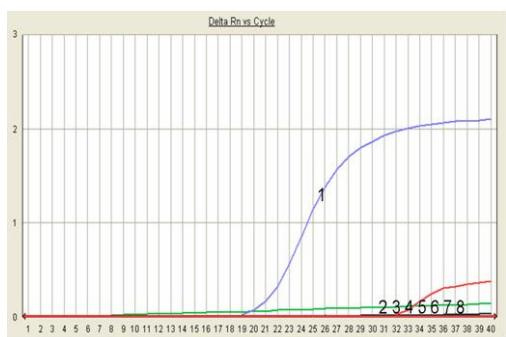


图 3 鉴别引物对缺失变异株和非缺失变异株的实时检测

1: pMD18-CHR 扩增曲线 2: pMD18-XH 扩增曲线; 3-7: PCV2、SIV、PRV、PPV、及大肠杆菌扩增曲线; 8: 阴性对照

2.4 荧光定量 PCR 与常规 PCR 检测方法灵敏度的比较 以经 10 倍系列稀释 ($1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝 / μL) 的标准质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 为模板, 鉴别引物鉴别后, 以检测引物进行扩增的荧光曲线 (图 4、5), 1.0×10^1 拷贝 / μL 仍有荧光曲线, 表明该方法检测灵敏度可达 1.0×10^1 拷贝 / μL 。以经 10 倍系列稀释 ($1.0 \times 10^{10} \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝 / μL) 的标准质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 为模板, 以检测引物对 pMD18-XH、以鉴别引物对 pMD18-CHR 进行常规 PCR 检测 (图 6、7), 结果显示常规 PCR 检测方法的最低检测浓度为 1.0×10^2 拷贝 / μL 左右。比较结果显示, 荧光定量 PCR 的检测灵敏度高于常规 PCR。

2.5 标准曲线的建立 荧光定量 PCR 结束后进对标准曲线行数据分析 (图 8、9), 重组质粒

pMD18-CHR、pMD18-XH 倍比稀释后得到的标准曲线分别为 $Ct_{pMD18-CHR} = -3.16\log(\text{DNA Concentrate}) + 37.67$ 、 $Ct_{pMD18-XH} = -3.15\log(\text{DNA Concentrate}) + 38.19$, 而待测样品的 Ct 值可从仪器读取; 把待测样品的 Ct 值代入表达式就可算出其初始拷贝数。

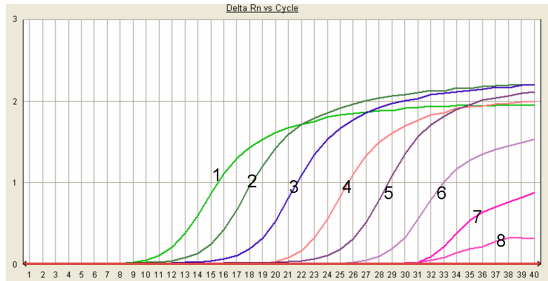


图 4 检测引物灵敏度检测

1~8: 阳性模板 cDNA10 倍梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-8}$)

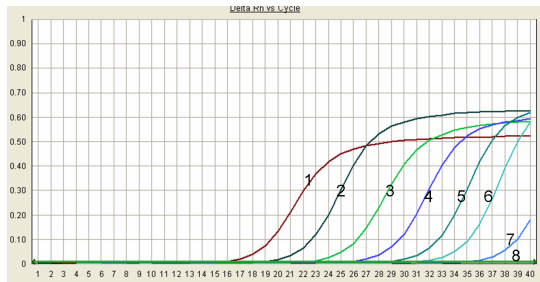


图 5 鉴别引物灵敏度检测 RT-PCR 扩增

1~8: 阳性模板 cDNA10 倍梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-8}$);

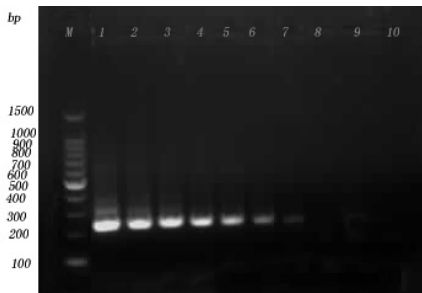


图 6 检测引物灵敏度检测的 RT-PCR 扩增

M: DL2000 DNA Marker; 1~9: 阳性模板 cDNA10 倍梯度稀释($10^0 \sim 10^{-8}$); 10: 以 H_2O 为模板的阴性对照

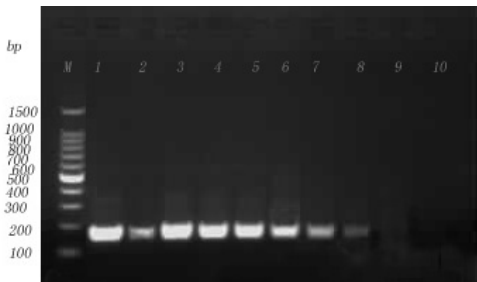


图 7 鉴别引物灵敏度检测的 RT-PCR 扩增

M: DL2000 DNA Marker; 1~9: 阳性模板 cDNA10 倍梯度稀释($10^0 \sim 10^{-8}$); 10: 以 H_2O 为模板的阴性对照

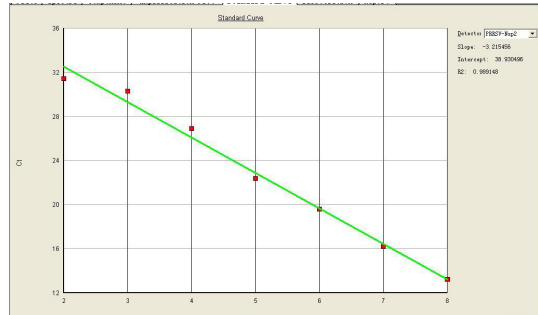


图 8 非缺失变异株定量 PCR 的标准曲线

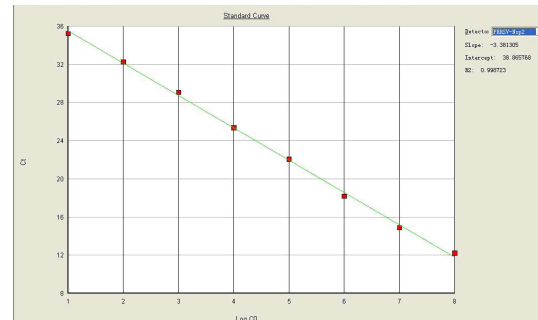


图 9 缺失变异株定量 PCR 的标准曲线

2.6 荧光定量 PCR 的准确性和重复性 起始浓度分别为 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 拷贝 / μL 的 pMD-CHR、pMD-XH 标准品的最终实测值的均值分别为 1.001×10^7 、 0.896×10^6 和 0.998×10^5 拷贝 / μL ; 变异系数分别为 4.75%、1.86% 和 3.86%, 说明此方法具有良好的准确性和重现性。

3 讨论

3.1 PCR 可对特定核苷酸片段进行指数级扩增。在扩增反应结束之后, 可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行定性分析, 也可以通过放射性核素掺入标记后的光密度扫描来进行定量分析。但无论定性还是定量分析, 分析的都是 PCR 终产物, 而且, 其临床应用的最大的弊端是假阳性污染。与传统的 PCR 相比, 荧光定量 PCR 对荧光实时动态连续监测, 消除了标本和产物的污染, 且无复杂的产物后续处理过程。更主要的是体系中同时加有特异性引物, 大大提高了检测的灵敏度、特异性和精确性。

3.2 本研究中我们采用 Ball 等^[9]的建议, 在每一个循环中 PCR 延伸后增加了一步, 即将温度提高至 $83^\circ C$ 后再采集检测反应体系中的荧光信号, 小于特异性扩增产物的 T_m ($85.9 \sim 87.0$) $^\circ C$ 而大于引物二聚体的 T_m ($78.8 \sim 80.30$) $^\circ C$, 此时引物二聚体均变性成单链, 此时检测到只是与特异性产物结合的 SYBR Green I 所发出的荧光信号, 消除了引物二聚

体的干扰,降低了非特异性荧光,有助于含量的准确定量。为进一步验证 PCR 反应的特异性,PCR 产物同时进行熔解曲线分析和凝胶电泳双重确定。PCR 产物的 T_m 主要依赖于其扩增的片段长度、GC 含量、序列组成、反应中 Mg^{2+} 浓度等因素。在本研究中,PCR 产物长 133 bp, 其对应的 T_m 为 85.9~87.0)°C, T_m 均一,峰的形状较锐利;引物二聚体的 T_m 为 (78.8~80.3)°C,二者显著分开。

3.3 由于质粒大量制备方便、稳定、浓度高、定量准确,还可应用于实验室内或不同实验室之间的定量分析,故一般采用质粒作为标准品。但是本实验过程中发现,由于质粒浓度过高时,其双链 DNA 所结合的 SYBR Green I 可以检测出荧光信号,这会对实验结果有一定的影响,降低其浓度可以降低或消除此影响。

3.4 对实时荧光 PCR,最简单、准确的定量方法是标准曲线法^[10~11],即用一系列已知浓度的标准品制作标准曲线,在同等条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较,从而得到目的基因的量。标准曲线是以起始拷贝数的对数为横坐标、Ct 值为纵坐标。理论上,依次十倍稀释标准品所得的标准曲线,其斜率应接近 -3.2。在实际应用中,当 $r > 0.95$,斜率 -3.0~-3.9 的标准曲线均被认为可行^[12]。目的基因的准确定量还依赖于 PCR 扩增的线性和效率,这两个参数均可由标准曲线获得。本研究中我们应用重组质粒 pMD18-CHR、pMD18-XH 倍比稀释后得到的标准曲线分别为 $Ct_{pMD18-CHR} = -3.16 \log(\text{DNA Concentrate}) + 37.67$ 、 $Ct_{pMD18-XH} = -3.15 \log(\text{DNA Concentrate}) + 38.19$,相关系数 r 分别为 -0.96 和 -0.99,保证了 Ct 值和 DNA 浓度对应 Log 值之间的线性相关;斜率为 -3.16 和 -3.15 对应的 PCR 扩增效率为 94% 与 99.2%,均在公认的可接受范围内。

3.5 本研究采用矩阵法对引物的浓度进行筛选,并经过反应条件的优化,建立了鉴别检测 PRRSV 经典变异株与缺失变异株的快速定量检测方法。该方法敏感度可达 1.0×10^1 拷贝 / μL ,具有良好的特异性和重复性。检测灵敏度远高于常规 PCR。对血清及猪体各种组织样品的检测结果显示,该方法具有很好的适应性。这为进一步研究 PRRSV 变异株在猪体内的分布、感染机制以及致病机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Po l J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *V et Q*, 1991, (13): 1212130.
- [2] DeaS, BilodeauR, Athanassious R, et al. Swine reproductive and respiratory syndrome virus in Quebec: isolation of an enveloped virus serologically related to Lelystad virus[J]. *Can V et J*, 1992, (33): 8012808.
- [3] Done S H, Paton D J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: Clinical disease, pathology and immuno suppression[J]. *V et Rec*, 1995, (136): 32235.
- [4] Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development[J]. *V et Microbiol*, 2000, (74): 3092329.
- [5] Mateu E, Martin M, Vidal D. Genetic diversity and phylo2 genetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain[J]. *J Gen Virol*, 2003, (84): 5292534.
- [6] Ostrowski M, Galeota J A, Jar A M, et al. Identification of Neutralizing and Nonneutralizing Epitopes in the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Ectodomain[J]. *J Viol*, 2002, (76): 4241-4250.
- [7] Ansari I H, Kwon B J, Osorio F A, et al. Influence of N-linked glycosylation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies[J]. *J Viol*, 2006, 3994-4004.
- [8] De Lima, Pattnaik A K, Flores E F, et al. Serologic marker candidates identified among B -cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus[J]. *Virology*, 2006, 353: 410-421.
- [9] Ball TB, Plummer FA, Hayglass KT, et al. Improved mRNA Quantitation in LightCycler RT-PCR[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003, 130(1): 82286.
- [10] Ke LD, Chen Z, YungWK A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards[J]. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(2): 1272135.
- [11] Johnson C R, Yu Wanqin, Murtaugh M P. Cross-reactive antibody responses to Nsp1 and Nsp2 of pocine Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus[J]. *J Virol*, 2007, (88): 1184-1195.
- [12] Van der Velden V H, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects[J]. *Leukemia*, 2003, 17(6): 101321034.

LUX™ 荧光 PCR 快速检测沙门氏菌的研究

许如苏¹, 陈茹², 林彩华¹, 杨梓坚¹, 陈冠武¹

(1. 汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 515031; 2. 广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

摘要: 本研究针对沙门氏菌 *invA* 基因的保守序列, 设计特异的 LUX™ 荧光标记引物, 通过优化反应条件和参数, 建立可快速检测沙门氏菌的 LUX™ 荧光 PCR 检测方法。结果显示, 该方法高度敏感, 其对纯菌的检测低限达到 10² cfu/mL, 经 6 h 增菌培养后检测, 对样品液的检测低限达到 1 cfu/mL; 特异性强, 测试的全部 13 株沙门氏菌标准和参考菌株均呈阳性反应, 测试的全部 27 株非目标菌均呈阴性反应; 重复性好, 定量检测批内和批间的变异系数均小于 2%。应用本方法检测食品样品 240 份, 结果检出阳性 4 份, 与 TaqMan 荧光 PCR 和 SN 标准检测结果完全一致。本方法可在 8 h 内完成对样品中沙门氏菌的检测, 其检测的快速性、敏感性和特异性与 TaqMan 荧光 PCR 技术相当, 且检测成本较低。

关键词: 沙门氏菌; LUX™ PCR; TaqMan PCR; 食品

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)05-0030-05

Development of a LUX™ PCR for rapid detection of Salmonella

Xu Rusu¹, Chen Ru², Lin Caihua¹, Yang Zijian¹, Chen Guanwu¹

(1. Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515031, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A LUX™ PCR method was developed for rapid detection of Salmonella based on the primers targeted for the conservative domain of *invA* gene of Salmonella using LUX self-quenched primer technology. The results showed that the method possessed high sensibility for detection of Salmonella and could detect as low as 10²cfu/mL of Salmonella and as low as 1cfu/mL from 6h-cultured artificial contaminated samples. Thirteen standard and reference strains of Salmonella were all detected positive, and 27 reference/standard strains of non Salmonella such as *V. cholera* were all detected negative. All of the coefficient of variation of intra-assay and inter-assay were less than 2% in the quantitative tests. The method was applied to detect 240 food samples, and 4 samples were positive. The results were consistent with those using the method of TaqMan PCR or SN. It took less than 8h to detect Salmonella in food samples. There was no difference in rapidity, specificity and sensibility between the LUX™ PCR method and TaqMan PCR method. But it was cheaper for LUX™ PCR method than TaqMan PCR method.

Key words: Salmonella; LUX™PCR; TaqMan PCR; food

沙门氏菌是最主要的食源性致病菌之一, 常通过污染食品感染人类, 导致食物中毒, 并可引发伤寒、副伤寒等沙门氏菌病。在世界各国的细菌类食物中毒中, 该菌常位居榜首^[1]。该菌已被世界各国列为食品卫生检验的主要致病菌, 我国食品卫生标准也将该菌列为必检的致病菌^[2]。

沙门氏菌的菌型极其繁多, 导致常规检验复杂繁琐、耗时费力。因此, 建立快速而准确的检验

方法一直是沙门氏菌检验研究的核心问题。关于沙门氏菌的快速检验, 已有多种方法, 如免疫磁性分离技术^[3]、酶联免疫吸附试验^[4]、快速酶促反应显色培养基法^[5]、PCR 技术^[6~7]、基因芯片技术^[8]等, 但这些方法各具优缺点, 且有一定的局限性。因此, 仍有必要继续开发具有快速、简便、准确、高效、经济的检验方法。LUX™ (Light upon extension) 荧光 PCR 技术于 2002 年由美国生物技术

公司 Invitrogen 发明^[9], 是一种将荧光探针与引物合二为一的新型实时核酸扩增技术。该技术的扩增体系较 TaqMan 荧光 PCR 简单, 因此, 不但检测成本较 TaqMan 荧光 PCR 低, 而且体系优化更简单。2003 年以来, 国内外已有应用 LUX™ 荧光 PCR 技术进行动植物疫病和病原微生物检测的研究报道^[9~15], 但目前国内尚未发现采用该技术进行食品中沙门氏菌的检测研究。

本研究根据 LUX™ 荧光 PCR 的技术原理, 针对沙门氏菌 *invA* 基因的保守序列, 设计特异的 LUX™ 荧光标记引物, 通过优化反应体系, 建立可快速检测沙门氏菌的 LUX™ 荧光 PCR 方法。经初步应用, 证实该技术具有快速、特异、敏感、方便、经济等优点。

1 材料与方法

1.1 菌株 标准菌株: 鼠伤寒沙门氏菌(50115)、肠炎沙门氏菌(39111)、猪霍乱沙门氏菌(1.1859)、大肠埃希氏菌(44113)、变形杆菌(49003)、宋内氏志贺氏菌(51334)、产气肠杆菌(AS1.2021)、绿脓假单胞菌(AS1.0212)、金黄色葡萄球菌(26003)、乙型溶血链球菌(32210)、副溶血性弧菌(AS1.16148)、创伤弧菌(1.1758)、蜡状芽孢杆菌(AS1.260)等购自中国菌种保藏中心; 副溶血性弧菌(ATCC17802)、溶藻弧菌(ATCC17749)、阪崎肠杆菌(ATCC29544)、单增李斯特菌(ATCC7644)、大肠杆菌 O₁₅₇:H₇(ATCC12900)等购自美国 MBL 公司; 参考菌株: 沙门氏菌 10 株, 其他致病菌株 12 株由笔者所在实验室鉴定保存。

1.2 主要试剂 Probes Master 2×conc. 购自 Roche 公司。TaqMan 荧光 PCR 检测试剂盒由笔者所在实验室研制提供。

1.3 主要仪器 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪、miniVIDAS 全自动免疫分析仪、高速离心机、系列微量加样枪、水浴锅、恒温培养箱、生物安全柜、超净工作台等。

1.4 样品来源 主要来源于进出口食品, 少部分来源于农贸市场。样品包括紫菜、饼干、糖果、禽产品、畜产品、水产品等。

1.5 模板 DNA 的提取 参照文献^[16]进行菌液或样品培养液的 DNA 提取。即取菌液或样品培养液 1 mL 于离心管中, 14 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 TE 液洗涤 1 次, 去上清液, 沉淀溶于 100 μL

超纯水中, 于沸水中煮 10 min, 立即冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min。上清液即为 DNA 模板。

1.6 探针的设计与合成标记 根据 GeneBank 中公布的沙门氏菌 *invA* 基因的保守序列, 采用 invitrogen 公司在线专业软件 (<http://www.invitrogen.com/lux>) 设计特异引物。对软件产生的多对引物进行配对和筛选, 再通过在线 Blast, 分析验证引物的特异性和菌株适配性。根据分析结果确定特异 LUX 荧光 PCR 引物。上游引物 5' 端添加夹形成序列, 3' 端标记 FAM 荧光基团。引物序列: CGGGACAACACATAGCCAAGCTCC [FAM]G (上游引物); AATCCAACAACCCATCAACAAGG (下游引物)。引物由美国 Invitrogens 公司合成标记。

1.7 LUX™ 荧光 PCR 方法的建立 以相关文献^[7,12]和仪器供应商推荐的反应条件为预反应条件, 通过对引物浓度和反应参数等的反复优化, 确定 LUX™ 荧光 PCR 的最佳反应条件为: 反应总体积为 20 μL, 内含 Probes Master 2x conc 10 μL, 10 μmol/L 上游引物 1.0 μL, 10 μmol/L 下游引物 2 μL, 模板 3 μL; 反应参数为: 预变性 95℃ 5 min, 1 个循环; 扩增 95℃, 10s, 60℃, 30s (检测荧光信号), 45 个循环; 熔解 95℃, 10s; 60℃, 10s。95℃ 连续收集荧光。

采用荧光定量 PCR 仪配备的分析软件进行数据分析与处理。阳性对照 CP 值(循环阈值) < 30, 且熔解曲线界面在 (84 ± 0.5)℃ 出现明显吸收峰, 阴性对照无 CP 值, 也无吸收峰者试验成立。按以下标准进行结果判定: 沙门氏菌的 CP 值 < 35, 且熔解曲线界面在 (84 ± 0.8)℃ 间出现明显吸收峰者为试验阳性; CP 值 ≥ 35, 熔解曲线界面在 (84 ± 0.8)℃ 间出现吸收峰者, 判为可疑, 需将样品增菌培养 6 h 后重新检验; 无 CP 值或虽有 CP 值, 但熔解曲线界面在 (84 ± 0.8)℃ 间无吸收峰或吸收峰偏离阳性对照吸收峰 1℃ 以上者判为阴性。

1.7.1 特异性检验 提取 40 株标准和参考菌株的 DNA, 并以此为模板, 进行沙门氏菌 LUX™ 荧光 PCR 试验以检测方法的特异性。

1.7.2 灵敏度检验及标准曲线的建立 将标准菌株过夜增菌培养, 按 1.4 提取 DNA 模板, 同时用菌落总数计数方法测定菌浓度。将 DNA 模板作 10× 系列稀释, 分别进行 LUX™ 荧光 PCR 试验。选取 5~6 个适当 DNA 浓度 (通常选用 10³~10⁸)

cfu/mL 菌浓度的 DNA 模板浓度), 以其对应的初始菌浓度对数值与 CP 值制作标准曲线 (由仪器配套软件自动生成)。

1.7.3 重复性检验 以 $10^4 \sim 10^6$ cfu/mL 菌浓度的 DNA 模板进行重复性试验, 每个菌浓度进行 3 次试验, 每次试验重复 3 次, 计算批内和批间 CP 值的变异系数。

1.8 对人工染菌样品的检测 取经 SN 0170-1992《出口食品沙门氏菌属(包括亚利桑那菌)检验方法》检验证实为沙门氏菌阴性的食品样品 25 g, 用缓冲蛋白胨水制成 1:10 匀浆, 加入适当浓度的沙门氏菌菌液。混匀后各取 1 mL 提取 DNA, 进行 LUXTM 荧光 PCR 试验, 剩余悬液置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, 培养 6 h 后重复上述操作。对染菌样品同时进行 TaqMan 荧光 PCR 检验比对。

1.9 对自然样品的检测 按常规方法将样品制成 1:10 匀浆, 置 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 6 h 后提取 DNA, 采用 LUXTM 荧光 PCR 进行检测, 同时进行 TaqMan 荧光 PCR 检测和 SN 标准检测比对。

2 结果与分析

2.1 特异性检验 试验结果见表 1。从表 1 可看出, 只有相对应的菌株出现阳性扩增, 其他非对应菌株均呈阴性反应。说明本研究建立的方法具有高度的特异性。图 1 为部分菌株 LUXTM PCR 特异性检测的扩增曲线(A)、熔解曲线(B)和吸收峰(C)。

2.2 灵敏度检验 LUXTM 荧光 PCR 对沙门氏菌纯菌的检测低限达到 7.6×10^2 cfu/mL。当沙门氏菌的菌浓度处于 $10^3 \sim 10^7$ cfu/mL 时, 初始菌浓度对数值与 CP 值呈良好的线性关系。沙门氏菌的误差(error)为 0.00481, 扩增效率(efficiency)为 2.051。详见图 2~图 4。

表 1 特异性试验结果

细菌	试验菌株数	LUX TM 荧光 PCR 反应阳性数
沙门氏菌	13	13
大肠埃希氏菌	4	0
志贺氏菌	2	0
变形杆菌	2	0
产气肠杆菌	1	0
其他细菌	18	0

2.3 重复性检验 重复性检验结果, 批内和批间 CP 值的变异系数分别小于 1% 和 2%, 表明本法具有良好的可重复性(见表 2)。

2.4 对人工染菌样品的检测结果 共检测 5 个不同浓度的染菌样品共 50 份, 结果显示, 当样品液沙门氏菌带菌量 $\geq 10^2$ cfu/mL 时, 采用本法可直接检出。如将染菌样品液培养 6 h 后再检测, 则该法对样品的检测低限可达到 1 cfu/mL。上述染菌样品同时采用 TaqMan 荧光 PCR 进行检测, 结果基本一致, 两种荧光 PCR 方法的检测灵敏度无明显差异(见表 3)。

2.5 对自然样品的检测结果 应用 LUXTM 荧光

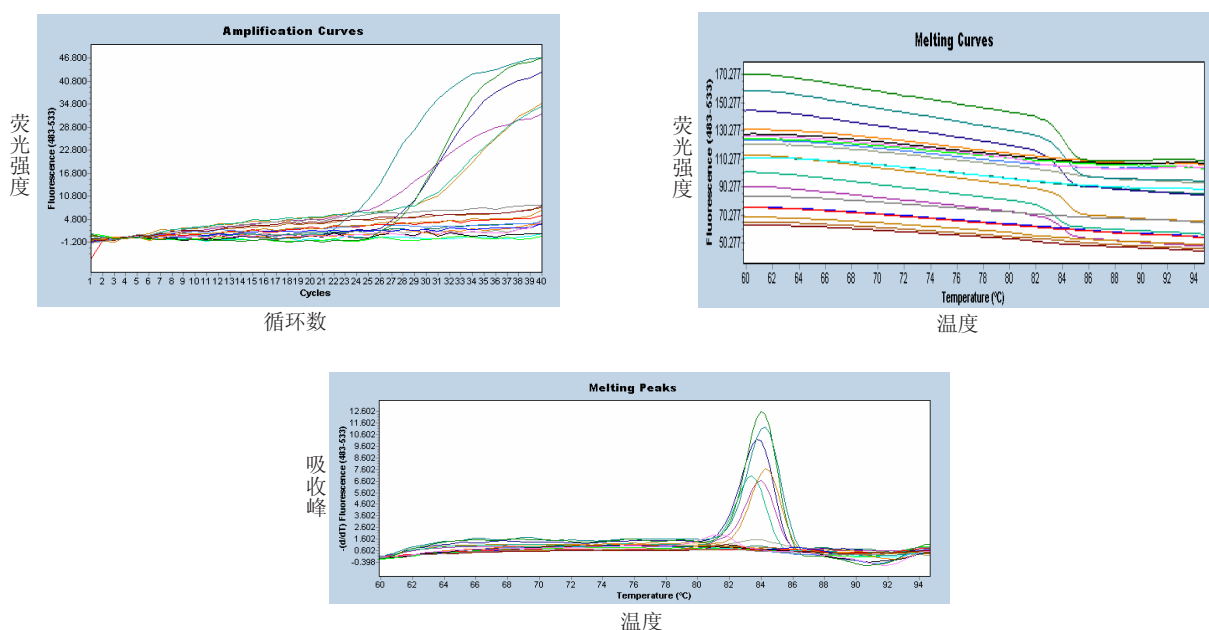


图 1 部分菌株 LUXTM PCR 特异性检测的扩增曲线(A)、熔解曲线(B)和吸收峰(C)

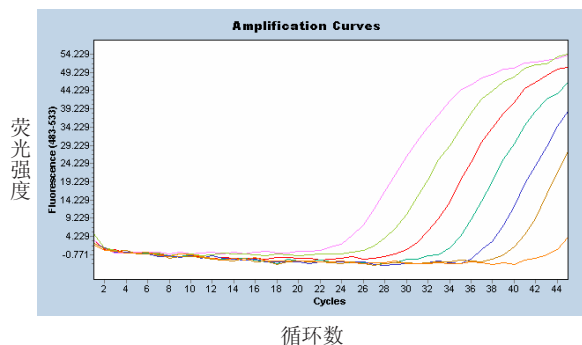


图2 LUXTM PCR 检测沙门氏菌灵敏度的扩增曲线
(从左到右分别为 $10^7 \sim 10^1$ cfu/mL)

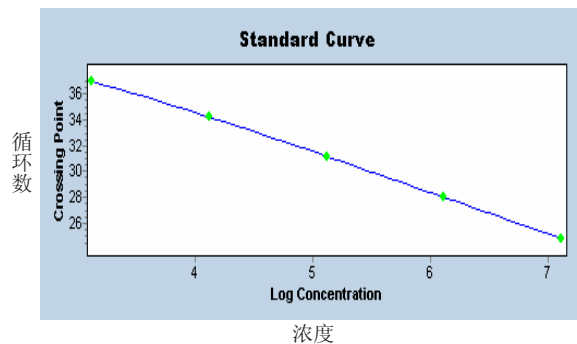


图3 LUXTM 荧光 PCR 检测沙门氏菌的标准曲线
误差 (Error): 0.00481, 扩增效率 (efficiency): 2.051

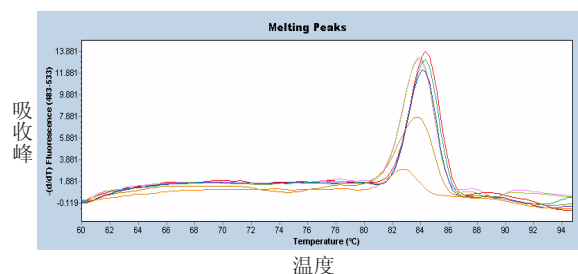
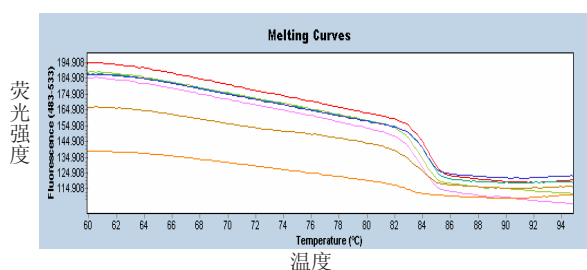


图4 沙门氏菌 LUXTM PCR 灵敏度检测的熔解曲线(A)和吸收峰(B)

表2 重复性试验结果

细菌浓度 (cfu/mL)	批内变异系数	批间变异系数
1.3×10^6	0.07%~0.56%	1.36%
1.3×10^5	0.20%~0.44%	1.27%
1.3×10^4	0.19%~0.54%	1.78%

表3 染菌样品 LUXTM 荧光 PCR 检测结果和 TaqMan PCR 检测结果比较

染菌量 cfu/mL	LUX TM 荧光 PCR 检测结果				TaqMan PCR 检测结果			
	0h	6h	0h	6h	0h	6h	0h	6h
	+	-	+	-	+	-	+	-
7600	10	0	10	0	10	0	10	0
760	10	0	10	0	10	0	10	0
76	2	8	10	0	4	6	10	0
7.6	0	10	10	0	0	10	10	0
0.76	0	10	10	0	0	10	10	0

PCR和 TaqMan 荧光 PCR 同时检测紫菜等即食食品、畜禽产品和水产品样品共 240 份, 并与 SN 标准进行比较。检测结果, 三种方法完全一致, 均检出沙门氏菌阳性样品 4 份 (见表 4)。

3 结论与讨论

本研究建立的 LUXTM 荧光 PCR 方法对所有沙门氏菌标准和参考菌株检测结果均为阳性, 对非沙门氏菌菌株检测结果均为阴性, 说明本方法具有高度特异性。对 50 份染菌样品和 240 份自然样

表4 三种方法对自然样品检测结果的比较

样品名称	试验数	阳性数		
		LUX TM PCR	TaqMan PCR	SN
即食食品	65	0	0	0
畜禽产品	100	2	2	2
水产品	75	2	2	2
合计	240	4	4	4

品的检测结果与 TaqMan 荧光 PCR 完全一致, 显示这两种方法具有同等的敏感性。重复性试验结果, 批内和批间 CP 值的变异系数均少于 2%, 显示本方法具有良好的可重复性。

将染菌样品液培养 6 h 后再进行 LUXTM 荧光 PCR 检测, 则该方法对样品液的检测低限可达到 1 cfu/mL 的带菌量, 说明本方法具有高度的敏感性。对于单个样品的检测, 从增菌到得出检测结果仅需 8 h, 可见本方法具有快速性。

本研究建立的 LUXTM 荧光 PCR 方法在检测的快速性、灵敏度和特异性方面与 TaqMan 荧光 PCR 方法无明显差异, 但检测成本明显低于 TaqMan 荧光 PCR, 这与文献报道一致^[9]。由于 LUXTM 荧光 PCR 方法采用类似于分子信标的发夹结构设计引物, 使引物同时起到荧光探针的作用, 扩增体系比较简化, 因而反应条件优化更容易。由于反应系统无需荧光探针, 因而试验设计条件更宽松^[14]。因

此, 采用 LUX™ 荧光 PCR 方法比采用 TaqMan 荧光 PCR 方法检测食品中的沙门氏菌更具优越性。但是, 引物携带的发夹结构容易引发二聚体的形成, 在目的菌浓度较低时, 可出现非特异扩增。虽然该技术增加了对扩增产物的熔解曲线分析, 能分辨非特异扩增或引物二聚体, 然而吸收峰出现杂峰还是会给结果判定造成一定困扰。因此, LUX™ 荧光 PCR 方法的建立关键是设计好引物。在引物设计时最好多设计几对, 先通过在线 Blast 验证, 再通过试验择优采用。

为提高方法的敏感性, 可适当增加反应体系中模板的量, 或在 DNA 提取时予以适当浓缩。

本研究建立的 LUX™ 荧光 PCR 方法具有快速、特异、灵敏、可重复等优点, 可在 8 h 内完成对样品中沙门氏菌的检验, 因此, 该方法可适用于食品中沙门氏菌的快速检验。

参考文献:

- [1] 王鑫, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法[J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 82-85.
- [2] 中华人民共和国广东出入境检验检疫局. 国内外技术法规和标准中食品微生物限量[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002. 1-50.
- [3] Skjerve E, Olsvik O. Immunomagnetic separation of Salmonella from foods[J]. Int J Food Microbiol, 1991, 14(1): 11-17.
- [4] Kryszinski E P, Heimsch R C. Use of enzyme-labeled antibodies to detect Salmonella in foods[J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(4): 947-954.
- [5] 张淑红, 吴清平, 张菊梅, 等. 显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 108-111.
- [6] Bej A K, Mahbubani M H, Boyee M J, et al. Detection of Salmonella spp in oysters by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(1): 368-373.
- [7] 许如苏, 林彩华, 陈其生, 等. 沙门菌和副溶血性弧菌双重荧光 PCR 快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 465-469.
- [8] 靳连群, 李君文, 晁福寰, 等. 基因芯片检测肠道中致病菌技术的建立和应用[J]. 中华传染病杂志, 2004, 22(1): 24-26.
- [9] 陈茹, 毕英佐, 曹永长, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒 LUX™ 新型荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(4): 303-307.
- [10] Rekhviashvili N, Stevens G, Scott L, et al. LUX primer for quantitation of HIV-1 by real-time RT-PCR[J]. Mol Biotechnol, 2006, 32(2): 101-110.
- [11] Nazarenko I. Homogeneous detection of nucleic acids using self-quenched polymerase chain reaction primers labeled with a single fluorophore LUX primers[J]. Methods mol Biol, 2006, (335): 95-114.
- [12] Chen R, Huang W, Lin Z, et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine retransmission gastroenteritis virus[J]. J Virol Methods, 2004, (122): 57-61.
- [13] 陈茹, 刘琳琳, 曾彩云, 等. 牛疱疹病毒 I 型二重 LUX 荧光 PCR 鉴别检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(11): 944-949.
- [14] 陈茹, 刘中勇, 曾碧健, 等. 水泡性口炎病毒血清型特异 LUX 实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(4): 522-528.
- [15] 许如苏, 陈茹, 林彩华, 等. LUX™ 荧光 PCR 快速检测副溶血性弧菌的研究[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(12): 1075-1079.
- [16] 许一平. 多重 PCR 检测沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006. 39.

(上接第 23 页)

开张, 恢复子宫收缩机能, 加强子宫腺体的分泌机能, 促进子宫分泌物的排出, 恢复正常的性周期。

2.4.3 PG 单独使用可辅助治疗子宫脱出 当子宫脱出时, 用 PG 1.2 mg (3 支) 与 3% 明矾水均匀撒布在脱出的子宫上, 促使子宫快速收缩, 有利子宫的整复。

3 讨论

3.1 这几种常用激素的使用, 是作者在实践中的一些总结, 但是否会引起一些副作用, 有待进一步的验证。

3.2 不论是在胚胎移植中的供体牛超数排卵、母牛

的同期发情、卵巢疾病的治疗, 还是其它方面的使用, 母牛的科学饲养管理是第一位的, 要在科学饲养管理的基础上正确使用激素才能达到应有的效果。

3.3 要严格按照适应症和用量来使用激素, 否则适得其反, 达不到效果。

参考文献:

- [1] 李铭, 吴柱月, 罗鲜青, 等. 广西地区荷斯坦牛超数排卵结果分析[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 53-56.
- [2] 李铭, 吴柱月, 陆维和, 等. 牛鲜胚长途运输后移植效果的试验[J]. 广西畜牧兽医, 2004, (4): 147-150.

四种兽用抗生素的体外抑菌效果评价

宋德平¹, 谢勇飞¹, 朱斌²

(1. 江西农业大学动物科技学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西赣州利华兽药有限公司, 江西 赣州 341000)

摘要: 本实验用试管药物稀释了四种兽用抗生素对猪常见病原菌和正常菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC)。通过实验发现: 各种菌对四种药物的敏感性存在很大的差异, 大多数细菌对药物 C 和 D 较敏感而对药物 A 和 B 存在较严重的耐药。

关键词: 抗生素; 抑菌; 最小抑菌浓度; 最小杀菌浓度; 耐药

中图分类号: S816.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2009)06-0035-03

Evaluation of bacteriostatic effect of four veterinary antibiotics in vitro

Song Deping¹, Xie Yongfei¹, Zhu Bin²

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Jiangxi, Nanchang 330045, China; 2. Lihua Veterinary Medicine Company Ltd., Ganzhou 341000, China)

Abstract: In this experiment, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of four veterinary antibiotics to some commonly seen pathogenic bacteria and normal bacterial flora in pigs were detected using the tube dilution method. The results showed that there was a great discrepancy between each bacteria's sensitivity to the four antibiotics. Most of the bacteria were sensitive to the antibiotic C and D, while resistant to A and B seriously.

Key words: Antibiotic; bacteriostasis; MIC; MBC; antibiotic resistance

随着畜牧业的发展, 抗生素、合成抗菌药物的大量使用和滥用造成的药物残留、抗药性越来越受到人们的关注。长期在饲料中大量使用抗生素、促生长剂对人类造成危害已是不争的事实, 如细菌耐药性的产生速度加快, 耐药菌株的大量涌现, 同时抗生素淘汰速度也不断加快, 新抗生素的研发速度始终赶不上细菌耐药性产生的速度, 在动物细菌性疾病的控制上越来越被动^[1]。

最小抑菌浓度 (MIC) 是抑制细菌生长的最低药物浓度。细菌对抗菌药物的敏感性, 通常以药物常用剂量在血清中的浓度大于 MIC 为敏感, 反之则为耐药^[2]。药物 MIC 的测定对指导临床用药和设计最佳给药方案具有重要意义。因此对 4 种兽用抗生素菌进行猪常见病原菌及肠道正常菌的 MIC 和 MBC 测定, 为临床配制治疗相关疾病及用药剂量提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基的制备 马丁肉汤、普通肉汤、普通琼脂培养基, 均参照文献^[3]配制。

1.1.2 药物 某兽药公司新开发的四种抗菌药物, 分别编号为: A (标示主药为磺胺-6-甲氧嘧啶, 含量为 10 mg/mL), B (标示主药为土霉素, 含量为 20 mg/mL), C (标示主药为林可霉素、庆大霉素, 含量各为 10 mg/mL), D (标示主药为环丙沙星, 含量为 5 mg/mL)。

1.1.3 实验菌株 链球菌、巴氏杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌、绿脓杆菌、枯草杆菌、酵母菌、乳酸杆菌等 10 种菌株, 由江西农业大学预防兽医教研室分离和保存。

1.1.4 主要仪器设备 ZDX-35BI 型座式自动电压力蒸汽灭菌器, WMK-02 型温度控制器, LRH-250-Z 振荡培养箱, YP202N 电子天平, AIR-TECH 超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 检测菌的准备 在已经保菌的菌种平板

上挑取单个典型菌落接种于新的平板,其中:链球菌、巴氏杆菌接种到鲜血琼脂平板上,活化培养 2 代后,挑取单个典型的菌落接种于 3 mL 马丁肉汤中;沙门氏菌、大肠杆菌接种于麦康凯平板,金黄色葡萄球菌、葡萄球菌、绿脓杆菌、枯草杆菌、酵母菌接种于普通琼脂平板,乳酸杆菌接种于 MRS 平板,活化培养 2 代后,挑取单个典型的菌落接种于 3 mL 普通肉汤中。上述肉汤均 37℃ 培养 6 h,再用生理盐水校正到 0.5 麦氏单位,校正后菌液用肉汤稀释 1:10(含菌量约为 1×10^7 CFU/mL)。

1.2.2 药物及其稀释方法 ①药物原液的配制 药物 A: 移取药物 A 1 mL 与 6.81 mL 灭菌双蒸水混匀配制成 640 μ g/mL。药物 B: 取药物 B 1 mL 与 14.63 mL 灭菌双蒸水混匀配制成 1280 μ g/

mL。药物 C: 取药物 C 1 mL 与 6.81 mL 灭菌双蒸水混匀配制成 1280 μ g/mL。药物 D: 移取药物 D 1 mL 与 6.81 mL 灭菌双蒸水混匀配制成 640 μ g/mL。②药物的稀释 各药物除编号为 1 的试管外,均采用倍比稀释法进行稀释。例如,药物 A: 取无菌试管 9 支,第 1 管加 1.8 mL 营养肉汤,第 2 到 9 管各加 1 mL 营养肉汤;以无菌操作将已稀释好的药物 0.2 mL 加入第 1 管混匀后吸取 1 mL 入第 2 管中,依次倍比稀释至第 8 管,混匀后自第 8 管弃去 1 mL。此时药液的终浓度分别依次为 640 μ g/mL, 320 μ g/mL, 160 μ g/mL, 80 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL, 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 第 9 管不加药物为对照。药物 B、C、D 同样依照 A 的步骤稀释(见表 1)。

表 1 四种药物的稀释方法

药物	试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9(对照)
药物 A	肉汤量 (mL)	1.8	1	1	1	1	1	1	1	1
	药液量 (mL)	0.2	1	1	1	1	1	1	1	0
	药物终浓度 (μ g/mL)	640	320	160	80	40	20	10	5	0
药物 B	肉汤量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	药液量 (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	药物终浓度 (μ g/mL)	128	64	32	16	8	4	2	1	0
药物 C	肉汤量 (mL)	1.95	1	1	1	1	1	1	1	1
	药液量 (mL)	0.05	1	1	1	1	1	1	1	0
	药物终浓度 (μ g/mL)	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0
药物 D	肉汤量 (mL)	1.95	1	1	1	1	1	1	1	1
	药液量 (mL)	0.05	1	1	1	1	1	1	1	0
	药物终浓度 (μ g/mL)	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0

1.2.3 药物的 MIC 的测定 用移液枪分别移取 100 μ L 稀释好的菌液加入各编号试管中。混匀后置于 37℃ 培养箱培养 24 h,以肉眼观察无絮状物或沉淀生成药物的药物浓度最低浓度管中即为该试验药物的 MIC。

1.2.4 药物的最小杀菌浓度(MBC)测定 将上述 MIC 测定中未见生长细菌的各管中的肉汤接种于营养琼脂平板上,链球菌、巴氏杆菌接种到鲜血琼脂平板上,沙门氏菌、大肠杆菌接种于麦康凯平板,做好标记,37℃ 培养 16~18 h,以仍无菌生长的管内药物浓度记为该药 MBC。

2 结果

2.1 四种药物对实验菌的最低抑菌浓度(MIC) 药物 A 的整体抑菌效果不好,在 640 μ g/mL 的浓度下,大多数菌仍能生长,只有链球菌的 MIC 为 320 μ g/mL,巴氏杆菌的 MIC 为 80 μ g/mL;药物 B

对各菌有一定的抑制效果,对链球菌和巴氏杆菌的 MIC 均为 128 μ g/mL,沙门氏菌 MIC 为 64 μ g/mL,而其他菌株在药物浓度达到 128 μ g/mL 时仍能生长;药物 C 对常见病原菌均有较好的抑制作用,特别是链球菌、巴氏杆菌的 MIC 仅为 1 μ g/mL,可作为临床用药;药物 D 在四种药物中的抑菌效果最好,对常见的病原菌的 MIC 比 A、B、C 均小很多,对链球菌的 MIC 小于 0.125 μ g/mL,沙门氏菌的 MIC 为 0.25 μ g/mL(见表 2)。

2.2 四种药物的最小杀菌浓度(MBC) 各菌对药物 A 的 MBC 均在 320 μ g/mL 以上,药物 B 的 MBC 在 128 μ g/mL 以上;药物 C 对常见病原菌的 MBC 在 1~32 μ g/mL 之间;药物 D 对常见病原菌的 MBC 在 0.25~16 μ g/mL 之间(见表 3)。

3 讨论

李义奎等^[4]介绍 MIC 的实验室方法有 3 种,分

表 2 四种药物对实验菌的 MIC($\mu\text{g/mL}$)

种类	药物 A	药物 B	药物 C	药物 D
链球菌	320	128	0.5	0.125
巴氏杆菌	80	128	0.5	0.5
沙门氏菌	>640	64	4	0.25
大肠杆菌	640	64	16	0.5
金葡菌	>640	>128	8	4
葡萄球菌	160	>128	<0.25	0.5
绿脓杆菌	>640	>128	8	0.5
枯草杆菌	>640	>128	0.5	0.25
酵母菌	>640	>128	>32	>16
乳酸杆菌	>640	>128	>32	>16

表 3 四种药物对实验菌的 MBC($\mu\text{g/mL}$)

种类	药物 A	药物 B	药物 C	药物 D
链球菌	640	>128	1	0.25
巴氏杆菌	320	>128	1	1
沙门氏菌	>640	128	8	8
大肠杆菌	640	128	32	4
金葡菌	>640	>128	16	16
葡萄球菌	160	>128	1	2
绿脓杆菌	>1280	>128	16	2
枯草杆菌	>640	>128	4	1
酵母菌	>640	>128	>32	>16
乳酸杆菌	>640	>128	>32	>16

别为纸片法、琼脂稀释法和肉汤试管稀释法。其他方法还有平皿打洞法、挖沟灌药法、杯管法、滤纸条法等。肉汤试管稀释法和琼脂稀释法均可作为体外抗菌作用研究方法,而前者较后者敏感,精确性、重现性好,且操作简便^[5],故本实验选用前者作为实

验方法。实验用的四种药物均为无色或微黄色,可以用肉眼观察加菌培养后的药液浑浊情况^[6]。

本实验结果显示,常见的病原菌对药物 A 和 B 存在较严重的耐药性,常规用药量几乎不可能抑制或杀死这些细菌。药物 C 和 D 对各病原菌的敏感性高,药物 D 对链球菌的 MIC 仅为 0.125 $\mu\text{g/mL}$,对沙门氏菌的 MIC 为 0.25 $\mu\text{g/mL}$,对巴氏杆菌、大肠杆菌、葡萄球菌、绿脓杆菌的 MIC 都为 0.5 $\mu\text{g/mL}$;药物 C 对葡萄球菌的 MIC 小于 0.25 $\mu\text{g/mL}$,对链球菌和巴氏杆菌的 MIC 为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。临床上用药时要选择 MIC 较小的药物,这样在常量用药时就可以抑制或杀死病原菌,而效果不好的药物临床上一一般会加大用药剂量,这样会对畜体造成不必要的伤害。

参考文献:

[1] 潘康成. 动物微生态学的研究与应用[J]. 中国家禽, 2008, 30(14): 33-33.
 [2] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
 [3] 姚火春. 兽医微生物实验指导. 第二版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
 [4] 李义奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991, 260-262.
 [5] 黎满香, 刘红旗, 陈可毅, 等. 试管法和纸片法抑菌实验的比较[J]. 中国兽医科技, 1997, 27(2): 31-32.
 [6] 陈文伟, 肖丽英. 8 种中草药对耐药金葡萄菌的最小抑菌浓度检测[J]. 广东药学, 2005, 15(3): 72-73.

(上接第 24 页)

2.4 加强对农村规模养禽场的监督管理 一是加强对规模养禽场的动物防疫条件审核, 对不符合动物防疫条件的, 责令其停产、停业、整改; 二是督促养禽场建立完善的生产、免疫养殖档案; 三是实行异地引种准入制。引种前必须到当地动物卫生监督机构申报, 引种后须经隔离、观察, 确认无病后方可混群饲养; 四是要加强疫情监测, 及时发现疫情隐患。

2.5 健全基层动物防疫体系

2.5.1 加大防疫经费投入 虽然上级部门再三要求“动物防疫经费列入各级财政预算”, 但山区贫困县要想保证经费足额到位, 确实很难。因此, 建议上级对山区农村的防控经费进行转移支付, 确保防控资金到位。不仅要因强制扑杀的家禽实行补偿, 还要对因禽流感免疫反应引起死亡的家禽实行补偿。

2.5.2 稳定基层畜牧兽医队伍 由于基层动物防疫工作与畜禽打交道, 社会地位低, 加上待遇不高,

难于吸引和留住大中专毕业生, 造成队伍不稳, 甚至断层。因此, 政府应出台优惠政策, 鼓励并招录畜牧兽医专业的大中专毕业生充实到基层畜牧兽医站工作, 使基层动物防疫队伍不断壮大, 力量不断增强。

2.5.3 大力培养村级防疫员 农村家禽饲养户分散, 线长面广, 而家禽免疫工作大多在早晨或晚上进行。家禽防疫工作量大, 任务重, 仅几名畜牧兽医站的工作人员难于完成如此巨大的免疫接种任务。因此, 政府必须加大投入, 大力培养一大批热爱动物防疫事业, 心系群众, 责任心强, 技术操作熟练, 能吃苦耐劳的村级动物防疫员协助完成家禽免疫和动物防疫法律法规宣传等工作。

2.5.4 加强技术培训 一要加强法律法规和专业知识培训, 全面提高基层畜牧兽医人员的法律水平和实践操作技能; 二要加强政治理论、职业道德教育, 树立全心全意为人民服务的观念, 使全体基层畜牧兽医人员爱岗敬业、文明服务。

白介素-15 真核表达质粒对猪瘟免疫增强效果的研究

夏芳¹, 罗满林², 陈瑞爱¹

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 肇庆 527400; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 将克隆至 pcDNA3.1 载体的含 pIL-15 基因真核表达质粒大量提取, 联合猪瘟疫苗免疫小猪, 并通过 ELISA 和猪脾脏淋巴细胞 MTT 试验测定 pIL-15 的免疫佐剂效果。ELISA 结果表明, pcDNA-IL-15 质粒免疫后, 能有效提高猪瘟抗体水平; 猪脾脏淋巴细胞增殖试验结果表明, 联合免疫后, 猪淋巴细胞免疫水平能得到明显提高。

关键词: 白介素-15; 猪瘟; 抗体水平测定; MTT

中图分类号: S852.43

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0038-02

Immune enhancement effect of IL-15 eukaryotic expressed plasmid on the immunization of classical swine fever

Xia Fang¹, Luo Manlin², Chen Rui'ai¹

(1. Guangdong Dahuanong Animal Health Products CO.,LTD., Zhaoqing 527400, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A large of eukaryotic plasmids pcDNA3.1 containing gene IL-15 were extracted and immunized to piglets with CSF vaccine. Its adjuvant effect was determined by the method of ELISA and MTT. ELISA results showed that the serum antibody against CSF was strongly increased after immunization with plasmid pcDNA-IL-15. The results of MTT test showed that the immunity of lymphocyte was improved strongly after combined immunization.

Key words: IL-15; classical swine fever; antibody detection; MTT

白细胞介素(Interleukin, IL)是由各种白细胞产生的、介导细胞间相互作用的细胞因子,在细胞的活化、增殖和分化中起调节作用。目前发现了29种白细胞介素,分别命名为IL-1~IL-29。其功能复杂,但都具有较独特的改善细胞功能的作用,有利于多种严重疾病的辅助治疗。

IL-15是Grabstein^[1]在检测猴肾上皮细胞系CV-1/EBNA培养上清液时发现的一种细胞因子。这种细胞因子能维持白细胞介素2(Interleukin-2, IL-2)依赖细胞系CTLL细胞的增殖,此外还具有调节B细胞、NK细胞和CTL细胞的功能。IL-15在适合浓度能迅速诱导记忆T细胞增殖,并能表达早期活化标记CD69^[2]。IL-15是一个强大的T细胞生长因子,可以有效刺激依赖IL-2的CTL L-2细胞和植物血凝素(PHA)激活的外周血T细胞的增殖^[3-4]。

IL-15极具免疫佐剂和免疫增强剂的潜力,

用IL-15做为佐剂,可增强抗原的提呈和刺激免疫细胞的分化。近期研究表明IL-15是一种优良的基因疫苗佐剂^[5]。

猪瘟是一种传染性极强的病毒性疾病,目前我国呈散发性流行,严重威胁着我国畜牧业的发展。本课题旨在研究猪白介素-15对猪瘟疫苗的免疫增强作用,以为猪瘟疫苗提供一种新型的疫苗佐剂,为更好地控制猪瘟做一些前期工作。

1 材料与方法

1.1 试验材料 质粒pcDNA-IL-15:由华南农业大学陈钜豪硕士构建,试验前由笔者按常规进行培养和抽提质粒DNA并定量。试验动物:35天龄大白仔猪30头,试验在温氏集团某猪场进行。猪瘟疫苗:山东齐鲁动物保健品有限公司生产。猪瘟抗体检测试剂盒:购自IDEXX公司。

1.2 动物试验方案 选取35天龄大白仔猪,随机

分为3组,每组10头。第1、2组为试验组,第3组为对照组。按猪场的免疫程序,仔猪35天、70天免疫猪瘟疫苗同时注射猪白介素-15真核表达质粒。免疫前、后14d各采血1次检测猪瘟抗体,第2次免疫14d采血后宰杀猪只取脾脏作MTT测定(见表1)。

表1 白介素-15对猪瘟免疫增强作用的动物试验方案

试验组别	试验1组	试验2组	对照组
第1次免疫	猪瘟疫苗+500 μ g 白介素-15	猪瘟疫苗+800 μ g 白介素-15	猪瘟疫苗
第2次免疫	猪瘟疫苗+800 μ g 白介素-15	猪瘟疫苗+1200 μ g 白介素-15	猪瘟疫苗

1.3 ELISA方法检测猪瘟抗体 参照IDEXX公司的《猪瘟病毒抗体检测试剂盒》说明书方法进行。

1.4 免疫猪脾脏T淋巴细胞增殖(MTT)试验

1.4.1 脾细胞的制备 二免14d后杀猪迅速取出脾脏,装入消毒的盒子内,于超净台内进行脾细胞的制备。制成单个脾细胞,加等量淋巴细胞分层液,2500 r/min离心15 min,吸取中间的白色淋巴细胞层,加入适量1640营养液,离心洗涤两次,用含有10%小牛血清、双抗的1640营养液将细胞数调到 1×10^7 个/mL。

1.4.2 猪脾细胞增殖试验(MTT法) (1)将稀释好的脾细胞加入96孔细胞培养板,每孔加入100 μ L细胞液,同时加ConA至终浓度为10 μ g/mL,每个样品设4个重复,同时设不加ConA的对照以及不加细胞的空白对照。37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养48 h。(2)取出96孔板,每孔加入10 μ L MTT(5 mg/mL),37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养3~4 h。(3)取出培养板,每孔加入100 μ L 10%SDS-0.01 mol/L HCl溶液,混匀,置37 $^{\circ}$ C CO₂培养箱中培养2 h。(4)以对照组调零,在酶标仪上读取波长570 nm的吸光度。记录结果,减去培养液对照OD值,即为待测样品OD值。

2 结果与分析

2.1 ELISA方法测定猪瘟抗体 试验猪分别在免疫14d后采血测猪瘟抗体,结果见表2。

表2 各个试验组免疫后猪瘟抗体的阳性率

组别	一免前 (35d龄)	一免后14d (50d龄)	二免前 (70d龄)	二免后14d (85d龄)
试验1组	40%	20%	70%	90%
试验2组	40%	40%	80%	90%
对照组	20%	0	70%	90%

在试验猪35天龄时,免疫猪瘟疫苗的同时注

入不同剂量的白介素-15真核表达质粒,一免14天后对照组10头试验猪猪瘟抗体整体下降,均为阴性,而试验1组的阳性率为20%,与对照组存在差异显著($p=0.024 < 0.05$);试验2组的阳性率为40%,与对照组也存在显著性差异($p=0.0487 < 0.05$)。二次免疫14d后,检测猪瘟抗体水平,结果显示试验组和对照组的阳性率都达到90%,试验组和对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

在测定猪瘟抗体水平试验中,对照组在一免14d后抗体水平阳性率降为0,而试验1组仍能保持在20%,试验2组保持在40%。说明白介素-15可有助于疫苗在提升抗体水平方面的作用。在仔猪70天龄时,对照组的猪瘟抗体阳性保护率为70%,与试验组水平相当,这时再免疫猪瘟疫苗的同时注入猪白介素-15,对提高猪瘟抗体水平作用不大。

2.2 猪脾淋巴细胞增殖试验 在二免采血后将试验猪取脾脏进行MTT试验(结果见图1),测定的MTT结果转化为增殖指数,进行Duncan's分析。结果表明,试验一组OD₅₇₀值高于对照组,但差异不显著($p > 0.05$),试验二组与对照组OD₅₇₀值则有显著性差异($p=0.019 < 0.05$)。表明在一定范围内猪白介素-15剂量越大,越有助于提高淋巴细胞免疫水平。

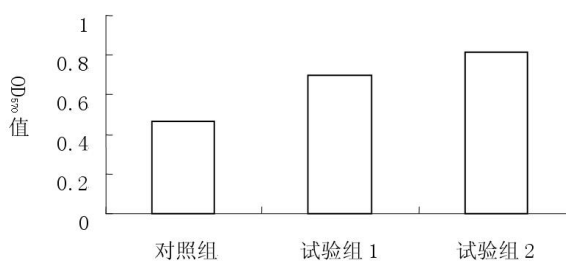


图1 各试验组淋巴细胞转化试验

由此推测,所提取的真核表达质粒在猪体内能成功表达,在MTT法测定猪脾淋巴细胞增殖试验中,增加猪白介素-15剂量有助于提高猪瘟疫苗的免疫效果,在一定程度上起到免疫增强的作用。

3 小结

本试验采用构建的pcDNA-IL-15质粒作为猪瘟疫苗的免疫佐剂免疫试验猪只,检测试验猪血清CSF抗体水平以及脾淋巴细胞增殖反应水平,结果显示构建的pcDNA-IL-15质粒可提高试验猪

(下转第47页)

野生草食动物源多杀性巴氏杆菌荚膜分型的研究

夏晓潮¹, 苏力², 陈武^{2*}

(1. 茂名市野生动物救护研究中心, 广东 茂名 525000; 2. 广州动物园, 广东 广州 510070)

摘要: 采用 Carter 荚膜群鉴定法对分离于我国黑鹿、白唇鹿、斑马和赤大袋鼠的 56 株多杀巴氏杆菌进行荚膜血清型鉴定, 结果表明: B 型占 78.6% (44/56), A 型占 14.3% (8/56), D 型占 3.6% (2/56), 另有 2 株未能确定型, 占 3.6% (2/56)。其中荚膜 B 型是斑马、黑鹿和白唇鹿源多杀性巴氏杆菌的主要血清群, 荚膜 A 型是赤大袋鼠源多杀性巴氏杆菌的主要血清群。黑鹿和白唇鹿源多杀性巴氏杆菌均存在 2 个血清群。

关键词: 多杀性巴氏杆菌; 荚膜型; 斑马; 黑鹿; 白唇鹿; 赤大袋鼠

中图分类号: S858.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0040-03

Capsule typing of *Pasteurella multocida* strains isolated from wild plant-eating animals

Xia Xiaochao¹, Su Li¹, Chen Wu²

(1. Maoming Rescue and Research Center of Wildlife, Maoming 52500, China; 2. Guangzhou Zoo, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Capsular serotype of 56 *Pasteurella multocida* isolated from Sambar, White-lipped deer, Zebra and Red Kangaroo of China were identified by using Carter capsular typing method. The results showed that B-type accounted for 78.6% (44/56), A-type accounted for 14.3% (8/56), D-type accounted 3.6% (2/56) and the unidentified capsular serotype accounted for 3.6% (2/56). B-type was the main serotype of *Pasteurella* isolated from Zebra, Sambar and White-lipped deer. A-type was the main serotype of *Pasteurella* isolated from Red Kangaroo. *Pasteurella* isolated from Sambar and White-lipped deer both belonged to 2 serotypes.

Key words: Zebra; sambar; white-lipped deer; red kangaroo; *Pasteurella multocida*; capsular serotype

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 是具有异质性特征的病原菌亚种群, 常引起牛、猪、鸡、兔等家养动物以败血症及呼吸系统疾患为主的疾病^[1]。1998 年, 陈武等^[2]报道, 多杀性巴氏杆菌可导致我国白唇鹿、黑鹿等草食动物出现急性败血症。多杀性巴氏杆菌不同菌株之间在宿主亲嗜性、致病力、碳水化合物发酵、菌落形态和抗原特异性等方面具有明显差异。由于荚膜血清型决定病原菌的免疫原性, 各血清型之间交叉免疫保护性较低, 因此对该致病菌进行荚膜分型甚为重要。为了解我国野生草食动物 Pm 的流行型, 笔者对分离于野生草食兽的 56 株多杀性巴氏杆菌采用 Carter 的荚膜群鉴定法^[3]进行血清学研究, 为研制野生草食兽的 PM 疫苗提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 总计 56 株菌, 系 1998-2007 年分离于广东、广西、湖北及海南省 8 个动物园 4 种

草食动物, 其中分离于斑马的多杀性巴氏杆菌 16 株, 黑鹿 28 株, 白唇鹿 6 株, 赤大袋鼠 6 株。

1.2 分离菌株鉴定标准 分离菌株符合下列标准: 革兰氏阴性球杆菌, 不运动; 接触酶、靛基质、鸟氨酸脱羧酶阳性; VP、M、R 阴性; 产生硫化氢, 不发酵乳糖。含 0.1% 裂解血的马丁肉汤 18 h 培养液 0.2 mL 腹腔注射小鼠, 24 h 内 100% 死亡。

1.3 荚膜群标准血清 Carter A、Carter B 及 Carter D 群血清购自中国兽药监察所。

1.4 参考菌株 C47-1 (B 型)、C48-1 (A 型) 购自中国兽药监察所; D 型菌株 gz215 (分离于猪) 由广东永顺生物制药有限公司惠赠。

1.5 实验动物 小鼠, 体重 8~12 g/只, 购自广东中医药大学实验动物中心。

1.6 间接血凝试验 参照 Sawada 方法^[4]进行操作。

1.7 醛化红细胞的制备 采集绵羊血与等量的阿氏液混合, 用 5 倍体积的生理盐水离心洗涤 5

次,沉积的红细胞用 PBS (pH 为 7.0) 配成 10% 的悬液,然后与 1% 戊二醛 4℃ 等量混合,作用 40 min 并不断振荡,室温离心洗涤 3 次,将沉积的红细胞以 PBS 配成 10% 的悬液,加终浓度为 0.01% 叠氮钠,置 4℃ 保存备用。

1.8 荚膜抗原的提取 将分离的各株菌与参考菌株分别接种含 0.1% 裂解血的马丁肉汤,37℃ 培养 18 h,每株菌各吸取 0.2 mL 腹腔接种小鼠。待其死亡后,无菌操作,用其肝 1 份加 4 份灭菌生理盐水制成乳剂,2 000 r/min 离心 15 min,取上清 0.2 mL 腹腔注射小鼠,死亡后取肝脏按上述方法再连续传 2 代。最后无菌操作取小鼠肝脏组织涂抹于马丁全血琼脂平板,37℃ 培养 24 h。各平板培养菌用 1.5 mL PBS 洗下,将洗下的菌液在水浴中煮沸 60 min,4 000 r/min 离心 15 min,取上清加终浓度为 0.01% 的叠氮钠,置 4℃ 保存。

1.9 致敏红细胞的制备 将 10% 的红细胞与等量的荚膜抗原混合,37℃ 作用 1.5 h,中间振荡 4 次,以 PBS 洗涤 4 次,再将红细胞悬浮于含 0.2% 牛血清白蛋白的 PBS 中,使其终浓度为 1%。

1.10 试验操作程序 在 V 型 96 孔反应板上,用含 0.2% 牛血清白蛋白的 PBS 对各分型血清作 2 倍系列稀释,每孔留存 25 μ L,然后于各孔中加入等量的 1% 致敏红细胞,在微量振荡器上振荡 2 min,置 37℃ 水浴作用 2 h,判定结果。以出现 100% 凝集的各型血清最高稀释倍数的倒数为间接血凝抗体价。对照组为未致敏的绵羊红细胞加各分型血清和稀释液的阴性对照及参照菌株的阳性对照。

2 结果

阴性对照组各孔均未出现凝集;阳性对照的 3 株参考菌株荚膜 A 型血凝价为 1:512;荚膜 B 型血凝价为 1:512;荚膜 D 型血凝价为 1:128。据此,对各株菌的血凝效价作判定。结果确定了斑马马源 16 株菌全部为 B 型,占 28.6% (16/56),血凝价为 1:64~1:1024;黑鹿源 24 株为 B 型,占 42.9% (24/56),血凝价为 1:64~1:1024;白唇鹿源 4 株为 B 型,占 7.1% (4/56),血凝价为 1:64~1:1024。来源于海口黑鹿的 4 株 Pm 菌为 A 型,占 7.1% (4/56),血凝价为 1:32~1:128;赤大袋鼠源 4 株为 A 型,占 7.1% (4/56),血凝价为 1:64~1:512。白唇鹿源 2 株 Pm 菌为 D 型,占 3.6% (2/56),血凝价为 1:32 和 1:64。来源于长沙袋鼠的 2 株 Pm 菌未能确定荚膜型,占 3.6% (2/56),见表 1。

表 1 56 株不同来源的多杀性巴氏杆菌荚膜分型结果

菌株来源	菌株数	荚膜型	间接血凝效价
斑马(广州)	5	B	1:64~1:512
斑马(深圳)	8	B	1:64~1:1024
斑马(南宁)	3	B	1:128~1:1024
黑鹿(海口)	7	B	1:64~1:1024
黑鹿(海口)	4	A	1:32~1:128
黑鹿(广州)	12	B	1:64~1:1024
黑鹿(南宁)	5	B	1:64~1:512
白唇鹿(广州)	4	B	1:64~1:1024
白唇鹿(广州)	2	D	1:32~1:64
赤大袋鼠(广州)	2	A	1:64~1:512
赤大袋鼠(南宁)	2	A	1:64~1:512
赤大袋鼠(长沙)	2	未定	NT

3 讨论

多杀性巴氏杆菌是引起多种动物出血性败血症的病原菌,由于其具有感染多种宿主的特性,而且不同血清型之间不能交叉免疫^[5],因此,对分离株的血清型鉴定及其主要流行型的确定是制备疫苗预防免疫能否成功的基础。

我国对家畜、家禽巴氏杆菌的血清型研究已较明确,而对野生草食动物的巴氏杆菌系统地进行荚膜型鉴定尚属首次。本研究针对近十年来我国部分动物园因出血性败血症而死亡的草食动物进行病原的分离鉴定,确定为多杀性巴氏杆菌后采用间接血凝技术进行荚膜分型,证实分离的 56 株菌中,44 株 Pm 菌为荚膜 B 型,占分离菌总数的 78.6% (44/56);8 株 Pm 菌为荚膜 A 型,占分离菌总数的 14.3% (8/56),2 株 Pm 菌为荚膜 D 型,占分离菌总数的 3.6% (2/56)。这为研制野生草食动物源多杀性巴氏杆菌疫苗提供了重要依据。

试验中袋鼠源的 2 株 Pm 菌未能确定荚膜型,可能是因为它们缺少荚膜或为粘液型菌株^[6],有待用其它分型方法证实。

从表 1 中可以看出,在某一地域如广州市,流行的 Pm 荚膜血清型以 B 型为主,但也有 A 型与 D 型流行。我国圈养的赤大袋鼠仅证实有 A 型荚膜血清型的多杀性巴氏杆菌流行,目前尚未发现其他荚膜血清型的多杀性巴氏杆菌感染。多杀性巴氏杆菌病是我国南方地区野生草食动物常见的疫病。对分离的某些多杀性巴氏杆菌的血清荚膜型鉴定,证实我国野生草食动物多杀性巴氏杆菌的血清型并不是单一的,动物出血性败血症可能是某一荚膜型的 Pm 菌感染为主。只有接种包括所

有流行血清荚膜型的巴氏杆菌多价疫苗才能为野生草食动物提供有效的保护。

参考文献:

[1] 闫新华, 闫喜军, 赵传芳, 等. 鹿“猝死症”病因的调查[J]. 经济动物学报, 1999, 3(2): 17-19.

[2] 陈武, 田纯见, 蔡勤辉, 等. 鹿科动物和斑马巴氏杆菌病的诊断[J]. 中国预防兽医学报, 2000, (1): 67-69.

[3] Carter G R. Studies on Pasteurella multocida. I. A hemagglutination test for the identification of serological types[J]. Am J Vet Res. 1955, 16(60): 481-484.

[4] Sawada T, Rimler R B, Rhoades K R. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of Pasteurella antibody[J]. J Clin Microbiol, 1982, 15(5): 752-756.

[5] 王明俊, 冀锡霖, 陈永娴, 等. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 467-468.

[6] 林锦鸿, 韩有库, 胡东良, 等. 我国禽多杀性巴氏杆菌血清型调查研究[J]. 中国畜禽传染病, 1987, (1): 1-4.



《广东畜牧兽医科技》征稿启事

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

1 征稿要求

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

2 文稿书写格式

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

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

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

彭礼繁¹, 罗光彬¹, 李东全¹, 陈自洪², 石德顺²

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

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

2.5 关键词 一般选用 3~8 个能反映论文主要内容的单词或术语。

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

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

2.8 计量单位 采用国家法定计量单位。

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

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

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

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

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

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

3 声明和约定

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

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

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

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

3.5 来稿时请注明作者详细地址、邮政编码和联系电话, 以便联系。

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

联系电话: 020-37288167 传 真: 020-37245052 E-mail: gdxmsykj@163.com

几种常见犬感染性血液病的诊治体会

张丽, 周方军

(佛山市先诺宠物医院, 广东 佛山 528000)

中图分类号: S852.65*5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0043-03

随着人们生活水平的提高,犬已进入人们的生活圈子,但相对的管理常识缺乏导致犬感染性血液病的发病率逐年增高。近年来,我院接诊因感染犬附红细胞体、犬埃立克氏体、犬巴贝斯虫而发病的多例病犬,经过血液病原学诊断及合理治疗取得良好的效果。现就这些疾病的诊治体会及预后判断与同行进行交流。

1 病原及感染途径

1.1 犬附红细胞体病 是由附红细胞体引起的一种人畜共患细菌性传染病,也称黄疸性贫血等。犬附红细胞体主要以吸血昆虫为媒介传播,感染动物后主要附着在红细胞表面或游离于血浆中。本病自然感染率很高,但多为隐性感染,可引起动物红细胞变形、皱缩以至于崩解,对机体免疫系统中T淋巴细胞的功能产生抑制,使机体抵抗力降低。结果导致机体消化系统、呼吸系统对其他病原菌的易感性增高,是引起其它多种疾病的诱因。

1.2 犬埃立克体病 是由寄生在单核细胞和中性粒细胞内的立克次氏体引起的一种犬科动物的败血性传染病。埃立克体为专性细胞内寄生菌,存在于动物循环血液中的白细胞和血小板中。临床上常见两种病原体,犬埃立克体主要侵害单核细胞,扁平埃立克体仅侵害血小板。犬埃立克体和扁平埃立克体主要靠血红扇头蜱作为传播媒介进行传播。

1.3 犬巴贝斯虫病 是由寄生于犬红细胞中的巴贝斯虫引起的一种血液原虫病。引起巴贝斯虫病的病原常见2种,即犬巴贝斯虫和吉氏巴贝斯虫。巴贝斯虫的发育需要蜱作为中间宿主,因此蜱是此病原的传播媒介。但也有报道,巴贝斯虫可通过胎盘传播。

除了天然的传播媒介外,临床输血则是三种病原体的另一传播途径。

2 症状及诊断

2.1 临床症状 三种病原体感染引发的疾病症状十分相似,均表现发热、食欲减退、贫血和恶病质,严重者呈不同程度的黄疸、血红蛋白尿等。根据临床症状一般不易作出准确诊断,需要配合实验室检查才能确诊。

2.1.1 犬附红细胞体病 主要以贫血、黄疸、软弱为基本特征,尤以仔犬和幼犬症状典型。临床表现为体温升高,食欲明显减退或废绝,有呕吐或腹泻现象,不同程度的脱水。随着病程延长,眼结膜苍白或黄染,尿色棕黄似豆油状,全身症状加重。

2.1.2 犬埃立克体病 以犬埃立克体感染最为常见,所引起的感染最为严重。临床以周期性发热、呕吐、黄疸、进行性消瘦、眼部流出黏液脓性分泌物、畏光和后期严重贫血等为特征。有的病例在腹部及腹股沟部出现红斑脓疱性疹。扁平埃立克体感染主要引起血凝不良,可见病犬呕吐物与粪便带血,约50%以上病犬鼻腔出血,且用止血药治疗无效。

2.1.3 犬巴贝斯虫病 急性病例以高热、溶血性贫血、眼结膜苍白或黄染、尿呈黄褐色、食欲减退或废绝为特征。慢性病例多见精神不振,渐进性贫血,眼结膜苍白、尿黄或为血红蛋白尿,间歇性发热和食欲时好时坏为特征。触诊脾脏常明显肿大,双侧或单侧肾肿大且疼痛。有肝损害时可见结膜黄染,偶有腹水、支气管炎、出血性紫斑或肌肉疼痛等。

2.2 血液涂片

2.2.1 犬附红细胞体病 病犬血涂片可见红细胞边缘不整、呈齿轮或星芒状,红细胞表面或周围有环形、圆形等形态的附红细胞体。采用姬姆萨染色后镜检,附红细胞体呈蓝褐色多形态小体。血液压片可观察到附红细胞体在血浆中能自由活动,当靠近红细胞边缘后就不再活动。

2.2.2 犬埃立克体病 病犬血涂片采用姬姆萨染色后镜检,胞浆包涵体呈蓝紫色。因埃立克体数量少,且包涵体的出现往往为一过性,所以病犬血涂片的检出率较低。如取离心后的抗凝血白细胞层涂片,可以提高感染白细胞的检出率。

2.2.3 犬巴贝斯虫病 病犬血涂片采用姬姆萨染色后镜检,可在红细胞内发现异染的多形性虫体。典型虫体为尖端呈钝角相连的双梨籽形,并位于红细胞边缘。发热期病犬血液中的虫体检出率高。

2.3 血常规检查 犬附红细胞体病和犬巴贝斯虫病的血常规检查结果基本相同,都表现红细胞数(RBC)显著减少,血红蛋白(HGB)含量降低。犬埃立克体病主要表现白细胞数(WBC)和血小板(PLT)显著减少。

3 治疗方法

临床治疗中通过对比观察,青霉素对附红细胞体病有较好的治疗效果。四环素对埃立克体的作用强,但其肝毒性很大,不适宜长期给药。对此类病犬宜先用四环素控制病情,待体温正常、临床症状改善后,再用低剂量土霉素持续给药1~3个月为好。埃立克体感染犬常表现不同程度的肝炎和免疫力低下,容易出现并发症,临床治疗中应配合使用护肝药物和免疫增强剂,如肝泰乐、肝炎灵、辅酶A、多种维生素、干扰素等。对于犬巴贝斯虫病的治疗,三氮脒(贝尼尔)的疗效确切,使用前配成5%溶液,深部肌肉注射,24 h后再注射1次。必要时配合土霉素口服,以控制附红细胞体、埃立克体等并发或继发感染。

4 典型病例

4.1 犬附红细胞体病

4.1.1 病史与检查 西伯利亚雪橇犬,6月龄,雌

性,体重15 kg,因食欲减退前来诊治。临床检查体温39.8℃,精神一般,食欲减退,尿黄似豆油状。血常规检查RBC、HGB、HCT略低于正常值(见表1),表明该犬轻度贫血。血涂片姬姆萨染色后镜检,可观察到大量蓝褐色附红细胞体。由此,确诊该犬为附红细胞体感染。

4.1.2 治疗 青霉素60万IU缓慢静脉滴注,强力解毒敏2 mL、V_{B12} 0.5 mL、V_C 2 mL肌肉注射,连用2天。然后按5 mg/kg口服土霉素,2次/d,配合使用护肝片达30天。

4.1.3 疗效 患犬体温、精神、食欲等于20 d后一切正常,血常规项目有明显改善(见表1),血涂片见红细胞感染率显著降低。

4.2 犬巴贝斯虫病

4.2.1 病史与检查 德国牧羊犬,雌性,7月龄,体重18 kg。一个月前主人在犬体表发现蜱寄生,现精神沉郁,饮食欲不振,可视黏膜苍白,呼吸急速,喜卧,易疲劳。检查体温40.5℃。血常规检查RBC、HGB、HCT、PLT明显低于正常值(见表2),表明该犬重度贫血。血涂片染色镜检发现少数红细胞内有巴贝斯虫。同时对抗凝血离心,取白细胞层做姬姆萨染色后镜检,未见其他虫体。因此,确诊该犬为巴贝斯虫病。

4.2.2 治疗 三氮脒3.5 mg/kg深部肌肉注射;肝泰乐2 mL肌肉注射,并配合其他支持疗法。连续用药2 d后,给予5~10 mg/kg土霉素,带回口服,2次/d,连服14 d。

4.2.3 疗效 用药2 d后病犬体温开始下降,食欲好转,活动增多。服用土霉素16 d后复诊,体温39℃,精神、食欲、活动耐力等一切正常。血常规检查RBC、HGB已接近正常参考值(见表2),表明该

表1 犬附红细胞体病典型病例治疗前后血常规检查结果对比

检查项目	WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT	PLT($\times 10^9/L$)
治疗前	6.7	4.5	100	30.0%	267
20d后	7.6	7.55	161	46.5%	288
正常参考值	6.0~16.9	5.5~8.5	120~180	37~55%	200~900

表2 犬巴贝斯虫病典型病例治疗前后血常规检查结果对比

检查项目	WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT	PLT($\times 10^9/L$)
治疗前	7.3	2.35	57	17.4%	192
16d后	12.6	5.35	117	38.3%	504
正常参考值	6.0~16.9	5.5~8.5	120~180	37~55%	200~900

犬贫血得到明显改善,正处于康复过程。血涂片未发现红细胞内有虫体寄生。建议犬主继续用药2周后前来复诊。

4.3 犬埃立克体病

4.3.1 病史与检查 金毛寻回犬,3岁,雌性,35 kg,因双侧鼻孔流血和用止血药治疗无效,前来诊治。检查体温39℃,精神、食欲基本正常,但腹围较大,球结膜黄染,其体表有蜱寄生。血涂片染色未发现巴贝斯虫,但在血小板上发现较大的蓝色颗粒。结合血常规和肝功能检查结果(见表3、表4)分析,确诊该犬为埃立克体感染。

4.3.2 治疗 犬血浆60 mL,四环素5 mg/kg,分别静脉滴注;V_{K1} 1 mL、肝泰乐2 mL、V_C 2 mL、V_{B12} 0.5 mL等分别皮下注射。连续用药2 d后,改为土霉素和护肝片连续口服。

4.3.3 疗效 用药两天后病犬停止流鼻血。20 d后电话回访获悉该犬一切正常,未有再流鼻血现象,而且结膜黄色减退。曾要求犬主带犬再来本院进行检查,但未能如愿。

4.4 混合感染

4.4.1 病史与检查 北京犬,3岁,雄性,5 kg,因精神沉郁,食欲减退等前来诊治。检查体温39.9℃,腹部敏感,便软,体表有蜱、跳蚤寄生,尿黄。血液涂片发现有大量附红细胞体,在个别红细胞内还发现巴贝斯虫。血常规检查RBC、WBC和HGB均有减少,而PLT减少显著(表5)。根据PLT显著减少分析,不能完全排除埃立克体感染的可能。

4.4.2 治疗 四环素5~8 mg/kg 静脉滴注;三氮脒3 mg/kg 深部肌肉注射;强力解毒敏1 mL、肝泰乐2 mL、V_C 1 mL,分别皮下或肌肉注射。之后改服土霉素5 mg/kg,2次/d,连用15 d。

4.4.3 疗效 第3 d体温恢复正常,同时食欲恢复。10 d后再做血检,血涂片中未发现巴贝斯虫,而附红细胞体也基本清除。

5 讨论与小结

5.1 犬的附红细胞体病、巴贝斯虫病和埃立克体病这三种疾病起初多为隐性感染,在临床上无任何症状时,其血液学检查多能发现异常。当感染犬出现临床症状时,疾病已发展到中期阶段,此时对疾病的准确判断和正确用药是提高治愈率的关键,而血常规检查和血液涂片镜检则是必要的检查内容。

5.2 对于这三种疾病的治疗,常常用药2~3次后有明显好转,但很难彻底清除病原体,容易复发。所以不能仅用药2~3次就忽视检查,而应在临床症状改善和康复后的半年内定期做几次血常规和血涂片检查,以了解血液常规指标的变化和病原体感染情况,有利于对治疗、预后作出评估。

5.3 在治疗上以杀灭病原体为重点,但更要注意病犬的身体状况,并加以必要的辅助疗法,尤其对贫血病犬可选择性输入全血或血浆,以缩短疗程和提高治愈率。在预防上应以消灭传播媒介为重点,通过采取各种措施杀灭犬体和饲养环境中的蜱、蚊虫、跳蚤等,即可比较有效地控制这几种常见血液病的蔓延传播。

表3 犬埃立克体病典型病例治疗前血常规检查结果

检查项目	WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT	PLT($\times 10^9/L$)
治疗前	4.7	2.9	68	20.5%	113
正常参考值	6.0~16.9	5.5~8.5	120~180	37~55%	200~900

表4 犬埃立克体病典型病例治疗前肝功能检查结果

检查项目	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBI($\mu\text{mol/L}$)	DBI($\mu\text{mol/L}$)	ALB(g/L)	GGT(U/L)
治疗前	5.9	46.4	63	26.6	2	5
正常参考值	4.0~66.0	8.0~38.0	2~15	2.0~5.0	24~38	12~64

表5 混合感染病例治疗前、后血常规检查结果比较

检查项目	WBC($\times 10^9/L$)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT	PLT($\times 10^9/L$)
治疗前	5.4	5.15	113	34.9%	82
10d后	10.2	6.7	119	36.3%	320
正常参考值	6.0~16.9	5.5~8.5	120~180	37~55%	200~900

犬胸段食道异物阻塞经胃切开术治疗一例

谭志文¹, 余殷兴¹, 孙怡琪¹, 苏永春², 黄志雄³

(1. 顺德区致爱动物医院, 广东 佛山 528300; 2. 顺德区动物卫生监督所, 广东 佛山 528300;
3. 广州得宝农山饲料有限公司, 广东 广州 510800)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)05-0046-02

食道阻塞在宠物临床门诊中, 是一种常见的消化系统疾病。根据其走向和解剖所处的管道位置可分为颈段食道阻塞、胸段食道阻塞两种。犬的食道阻塞多发生在胸段食道, 主要在心基和膈的食管裂之间的食道。造成该病的主要原因是由于犬过度饥饿或进食时突然受到惊吓而导致急速吞咽而引起; 也可能是食物中混有尖硬骨头、鱼刺、塑料袋等阻留在消化道引起。笔者在临床中接诊了一例因吞食骨头而致的胸段食道阻塞, 最终通过施行经胃切开术治疗取得满意的效果。现将手术全过程以及体会报道如下:

1 病例介绍

西施公犬, 5月龄、体重约6 kg。2008年6月18日中午突然发病。据主人介绍中午采食后出现呕吐, 呕吐物为白色混浊物。精神亢奋, 左右滚转呻吟。过一段时间后呕吐持续, 剧烈疼痛, 嚎叫不安, 大便稍稀。当地兽医站误诊断为食物中毒, 经用0.5%阿托品和维生素C等药物治疗效果不佳, 反而出现的哽咽呕吐动作逐渐加重, 大量流涎。宠物主人爱犬心切, 于下午转诊本院就医。接诊时该犬体温39℃, 呼吸45次/min, 心跳118次/min, 精神沉郁, 呼吸极为困难, 口腔苍白, 食欲废绝, 流涎。腹部触诊敏感, 患犬生命垂危。随即肌内注射肾上腺素0.3 mL、尼可刹米0.3 mL, 静脉推注5%碳酸氢钠5 mL。15 min后症状有所缓和, 随即为患犬进行一系列详细检查。

2 临床检查

2.1 血常规检查 无菌操作采集犬外周静脉血液, 作抗凝处理后计数。检测结果: 白细胞总数升高, 提示机体有炎症反应(见表1)。

2.2 X线检查 先取一匙调制糊状的钡剂, 将少量棉花(如常用酒精棉球大小)放入钡剂中搅拌, 然

后将钡剂和棉花一起强行喂犬, 使其吞下, 胸侧位作透视检查。在正常犬, 棉团能迅速通过食道进入胃中。在发病犬中, 有的病例食道阻塞部上段食道扩张, 浸有钡剂棉团的阴影在扩张的食道中上下浮动, 这提示食道发生了完全阻塞; 在有的病例仅可见到棉团阴影滞留于阻塞部2~5 min, 或更长时间, 然后才进入胃中, 这说明发生了不完全阻塞。

表1 血常规检查结果

检验项目	检验结果	正常值范围
白细胞总数	$29.9 \times 10^9/L$	$6 \sim 18 \times 10^9/L$
红细胞总数	$6.2 \times 10^{12}/L$	$5.8 \sim 8.51 \times 10^{12}/L$
血红蛋白(g/L)	201	133~197

本例胸侧位X线特征: 见骨头位于贲门口处。在胸腔第6~7肋骨间食道内有一高密度的亮团, 阻塞物较大且形状不规则。根据显示的形态结构和位置及病史询问, 据此诊断为: 胸段食道骨头不完全阻塞(见图1~2)。



图1 胸部X线侧位片

3 手术治疗

3.1 麻醉与保定 征得宠物主人同意, 决定全身麻醉后实施开食道异物取出术(麻醉前15 min注射阿托品), 肌内注射速眠新麻醉剂, 按0.1 mL/kg体重使用。待犬进入全身麻醉状态后, 仰卧保定固定于手术台上; 术部周围剪毛, 常规消毒覆盖创巾。



图2 术后取出的骨头

3.2 术式与手术过程 在剑状软骨至脐连线的中点,腹正中线上做18 cm长切口。切开皮肤,钝性分离皮下组织,暴露腹腔后,即可见到膨胀的胃,然后轻轻将胃壁大弯部自腹腔提到创口外,用浸有青霉素生理盐水的纱布填充于腹壁切口与胃之间。

术者手指进入胃内,通进贲门进入食道探摸异物。若手指触及到异物时,可将弯型长臂肠钳在手指引导下伸进食道,注意要操作轻柔,不要损伤食道。触及食道内坚硬骨头后,再用长臂肠钳取出(注意不要污染周围组织)。取出异物后,术中可见阻塞处食管粘膜充血水肿,色泽变暗。最后将胃部分提起后对肌层仔细检查,有没有破裂及出血。胃部切口用纱布压迫止血,用生理盐水彻底清洗创口,胃切口的粘膜层用可吸收肠线全层连续缝合,浆膜肌层内翻缝合。注意缝合要致密,但缝针不得穿过胃全层,并避开血管,缝线要用可吸收缝线(如羊肠线)。缝合完毕,缝合完闭的胃组织后还纳于腹腔。用生理盐水反复冲洗腹腔,再用甲硝唑液冲洗,防止胃内容物污染腹腔,常规闭合腹腔并整理创缘皮肤,涂擦碘酊消毒。

(上接第39页)

猪瘟抗体水平,增强其脾淋巴细胞增殖反应,具有良好的佐剂作用。

参考文献:

- [1] Grabstein K H, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor[J]. Science, 1994, 264:965-968.
- [2] Kanegane H, Tosatoq, Smedt M. Activation of naive and memory T cells by Interleukin-15[J]. Blood, 1996, 88:230.
- [3] Bamford R N, Grant A J, Burton J D, et al. The interleukin (IL)-2 receptor Betas is shared by IL-2 and a cyto-

3.3 术后护理 ①术后给予抗生素治疗及止血敏处理;②禁食3 d,防止食物污染胃内切口,以免影响切口愈合。③输液维持体能,防止脱水;改善电解质紊乱,纠正酸中毒。④防止舔咬腹壁切口影响切口愈合。⑤3 d开始喂给流食,以少量多次饲喂为好。⑥术后应该注意保暖,7 d后该犬恢复正常并拆缝线。一个月后电话回访,该犬活泼如初,并且没有并发症。

4 讨论与小结

4.1 犬胸段食道阻塞症状与食物中毒等疾病相似,临床应注意鉴别诊断,不能单凭临床出现的症状而妄断下结论,应该仔细检查,找出原发病因,以免误诊。运用X线检查是诊断食道阻塞比较好的方法之一。通过X线检查,显示该病的内部情况,作出准确的评估,以便制定手术治疗方案。

4.2 由于骨头阻塞的部位在胸部,开胸手术较危险,胸段食道异物经口腔或颈段食道切开术排除较困难,试行经胃切开术排除。本病例采取胃切开术以协助食道内骨头的排除增加了整体的安全性,也是一种排除胸内食道阻塞较安全的方法。运用此术式方法操作,巧好避免了很多开胸术的风险,大大提高了患犬生命的安全系数。

4.3 患犬是5月龄的幼犬,正处于生长发育时期,消化功能不健全,应尽可能避免饲喂肉类、骨头等食物,以防止异物阻塞现象发生,建议最好饲喂浸泡过的犬粮或半流质食物。幼犬对食物没有很好的自我调食能力,特别注意控制好日常食量,以免在急速吞咽过程中发生阻塞,建议定时定量的饲养方式。

kine, Provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:4940-4944.

- [4] Bamford R N, Grant A J, Burton J D, et al. The interleukin (IL)-2 receptor Betas is shared by IL-2 and a cytokine, Provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:4940-4944.
- [5] Lillehoj H S, Min W, Choi K D, et al. Molecular, cellular and functional characterization of chicken of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2[J]. Vet Immunol Immunophol, 2001, 82(1-2):229-244.

以循环经济促畜牧业可持续发展

汤道玲

(南通市农业局, 江苏 南通 226006)

中图分类号: S852.65*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0048-02

目前循环经济在发达国家工业体系中取得了一些成绩,同时,发展中国家正在紧锣密鼓地开展循环经济理论和实践探索。勿容置疑,畜牧业的发展在我国“菜篮子工程”历史上写下了辉煌的一页,同时,也在人们最为关注的环境污染领域留下了浓浓的一笔。畜牧业发展与农村生态环境保护、人畜安全密切相关,尤其是在遭遇了“猪流感”、“禽流感”之后,人们更应该强烈意识到实施循环经济与清洁生产已势在必行,刻不容缓了。

1 循环经济的定义和原则

2008年8月29日,十一届全国人大常委会第四次会议表决通过《循环经济促进法》,并已于今年1月1日实施,由此可见,我国高度重视发展循环经济。该法中所称循环经济,是指在生产、流通和消费等过程中进行的减量化、再利用、资源化活动的总称。该法倡导在物质不断循环利用的基础上发展经济,建立资源—产品—再生资源的新经济模式,以彻底改变资源—产品—污染排放的直线、单向流动的传统经济模式。循环经济是以环境无害化技术、资源回收利用技术与清洁生产技术为载体的一种生态经济。清洁生产是指对工艺和产品不断运用综合性预防战略,以减少其对人畜和环境的风险。

循环经济的主要原则是:减量化(Reduce)即在生产、流通和消费等过程中减少资源消耗和废物产生;再利用(Reuse)即将废物直接作为产品或者经修复、翻新、再制造后继续作为产品使用,或者将废物的全部或者部分作为其他产品的部件予以使用;再循环(Recycle)即将废物直接作为原料进行利用或者对废物进行再生利用。在循环经济中的三者的重要性不是并列的,其优先顺序是:减量化——再利用——再循环。以上就是著名的“三R”法则。循环经济的实施将使资源和能源得到最合理和持久的利用,并使经济活动对环境的不利影响降低到尽可能小的程度。循环经济完全符合可持续发展战略的思想,对环境和资源保护有益,对子孙后代有益。

2 畜牧业实施循环经济的主要途径 (“三R”法则在畜牧业的应用)

2.1 减量化

2.1.1 建立科学合理畜禽舍 结合农业可持续发展的需要,通过科学设计、因地制宜、合理布局,建立标准化畜禽舍,采用砖混结构,彩钢瓦封顶,地面和墙壁用水泥粉刷,有利于降低能耗,有利于清扫和消毒,减少冲洗水量,从而减少污水排放量。山东省临朐县发展以户为单元的“五建四养三追一浸一种”生态农业模式。“五建”指的是在农户庭院内建设沼气池、太阳能畜禽暖社、厕所、太阳能浴室、省柴灶;“四养”指的是在庭院内养猪、奶山羊、蛋鸡、兔;“一浸”指的是利用沼液浸种;“一种”指的是利用秸秆种植食用菌。该模式以生态学、经济学、系统工程学为原理,以土地资源为基础,以太阳能动力,以沼气为纽带,种植业和养殖业相结合,通过生物质能转换技术,在全封闭的状态下,将沼气池、畜禽舍、厕所和日光温室等组合在一起,形成一种典型的北方“四位一体”生态农业模式。

2.1.2 转变饲养方式,提高劳动效率 推进现行饲养方式的转变必须依靠科技。要通过建立新型的畜牧科技创新体系,大幅度提高畜牧科技创新能力。它是一项巨大的系统工程,必然要涉及到使用良种、建立良繁体系,饲草料的科学加工、利用,推广先进的科学饲养管理技术、疫病防治和畜产品产业化体系建设等5个基本方面。只有通过多种技术的集成化和模式化,才能取到理想的效果。

2.1.3 改进环境控制方法,减少环境污染 采用横向换气法,畜禽舍内空气的清新鲜度难以保证。现在,统一改为纵向负压通风,风机开启时就使整幢畜禽舍成为一个通风巷道,除进风口外,使室内产生的含有氨气、硫化氢和其他恶臭的污浊空气得到排放,同时又能使畜禽舍外的新鲜空气及时向室内补充,从而保证了畜禽健康。在电源开关上安装定时器,根据畜禽的具体情况及时外界温度的变

化,设定风机开启的次数和持续时间。

2.2 再利用

2.2.1 生产生物有机肥 将畜禽粪便、垫料、死淘畜禽等采用堆肥法,利用生物热发酵,经除臭、干燥、制粒等过程制成生物有机肥,或加入无机成分制成复混肥,供花卉、苗木及农田施用,经过这样的循环利用,减少了畜牧业生产产生的废弃物对畜禽的污染、疾病传播和对周围居民生活等诸多不利因素影响。

2.2.2 畜禽粪的加工再利用 经检测:干鸡粪中含 30%粗蛋白、26%灰分、23%无氮浸出物和 10%粗纤维,其中色氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、丝氨酸较多,可用于牛羊等反刍家畜饲料。非蛋白氮在瘤胃经微生物分解,合成菌体蛋白,然后再被消化吸收。另如,肥堆养殖蚯蚓,主要利用果园、桑园、饲料园、菜园、大田等园地,有条件、规模较大的企业可以进行大棚工厂化养殖,提高效率。

2.2.3 清洁能源的生产 结合生态农业的综合开发,畜牧业与种植业做到有效衔接,加上以沼气发酵为主的能源生态工程、粪便生物氧化塘多级利用生态工程,可将家畜排泄物和农作秸秆等废弃物资源化,向农户提供清洁的生活能源和生产能源。福建的圣农公司和武汉凯迪公司合作建设我国首个鸡粪发电厂,年处理鸡粪 30 万吨以上,年发电量 1.68 亿千瓦时,不仅满足鸡场供电,而且向社会供电,经济和生态效益都十分明显。

2.3 再循环

2.3.1 促进水再生 畜禽生产需要大量用水,且利用率非常低。对于鸡场冲洗、生活污水通过沉淀池再进入化粪池排放或与粪便混合加工成有机肥,沉淀池定期清淤;对冲洗消毒水采用砂池高位低渗过滤后安全排放,或再经离子交换器处理后

循环利用,以充分节约水资源。

2.3.2 汇集利用 大多数种禽场因生物安全的要求,禽舍与禽舍之间设有防疫沟,一般宽 3~5 m,深 2.5~3.5 m。日常禽舍周围道路冲洗水、用具冲洗水等都汇集其中,可以生长水生植物和养鱼,从而达到生物净化的目的,定期清淤即可。空舍清塘时,加消毒剂灭菌,水和淤泥可用于场内花木栽培。

2.3.3 封闭式循环利用技术 该技术模式是“猪—沼—藻—猪”闭合循环。核心是利用小球藻的几何式裂变原理对沼液进行净化。其技术要点包括:一是粪便、废水等通过沼气池发酵,解决废物排放污染问题;二是沼气用于仔猪保温、照明、煮饭等日常热能,节约能源;三是沼液用于养藻,使沼液净化成可再利用的二级水;四是以藻为主要原料加工成饲料(添加剂)进行喂猪,提高猪的生长速度和产品质量。

3 加大循环经济在畜牧业的推进力度

3.1 加大补贴力度 目前,各级政府高度重视高效规模农业的发展和环境能源的保护,加大支持循环经济在畜牧业乃至整个农业中的实施与推进项目的补贴力度,充分调动农业企业和农户发展循环农业经济的积极性,使得畜牧业低投入、无污染、高产出。

3.2 加大宣传与引导 循环经济在农牧领域还是个新名词,在我国工业行业起步也较晚,人们对它的认识与理解还不足,这就需要政府、媒体、行业协会等多种渠道、多种方式、对不同类型的受众进行宣传,使政府决策者、企业主管、工程技术人员以及老百姓接受环境理论学和可持续发展的观念。

3.3 加强监督与管理 环保、农业、公安等相关部门各司其职,加强协调配合,按照相关法律法规,切实履行职责,加大对污染排放的打击力度,加大对循环经济在畜牧业安全生产中引导力度。

2009“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 2009 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 2010 年第 1 期公布。

- 1、**评选范围:**本刊 2009 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:**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
二〇〇九年一月二十六日

猪场容易忽视的几个问题

吴同山

(东莞市畜牧科学研究所, 广东 东莞 523086)

中图分类号: S815.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)06-0050-02

经历了 2006-2008 年席卷全国的猪病流行后,大部分猪场在饲养管理、疫病防治、猪群调整、消毒防疫、营养控制、原料把关等环节方面加强了管理,工作比较到位,生产成绩有明显的恢复。但还有少数猪场尚未恢复到正常的水平,这主要与经营管理者与饲养员的细心程度低、责任感不强或管理水平较低有关。在猪场日常工作中,有几个容易被忽视但又很大程度地影响生产的问题,现简述如下,以期为不断完善猪场的管理工作提供参考。

1 病弱残猪的处理

猪场或多或少地都有一些病弱残猪(由于种猪大部分为固定栏饲养,容易发现和调理;这里主要指保育猪、育成育肥猪),处理的方法不同,效果也不同。病弱残猪如不从大栏里面挑出来,特别是商品猪,难以抢到饲料,健康状况和生长速度逐渐掉队,最终可能成为僵猪或死亡。挑出来单独饲养后,从采食、保温、护理等方面下工夫,如对不食饲料的猪给一些青绿多汁的青草青菜,倒地不起的想办法让猪喝到水等,想办法让病弱残猪的身体得到恢复,否则一样会变成僵猪。这部分猪处理得不好,将给猪场会造成一定的经济损失。

措施:在保育舍、育成育肥舍外面,根据存栏规模的大小,就地取材,在空地上围一个大小合适的隔离栏,地面不要铺设水泥,每头猪占地 2m²以上,装上饮水器和料槽,在其中的一角搭一个冬季保温、夏天遮阳的棚,对于小猪,冬天必要时设一个保温箱。对于保育舍、育成育肥舍大栏中生长速度慢、受到损伤等病弱残猪,及时调整出来集中饲养,在饲料适口性、饮水、保温等方面加强管理,不能食料或食欲不振的,通过饲喂青草青菜等措施

提高食欲;倒地不起的要保证饮水,辅以对症治疗,大部分猪只会慢慢恢复到健康水平。无法恢复者应及时淘汰。

2 恒温冰箱温度

在冬季,很多采用人工授精配种技术的个体猪场(大型猪场人工授精实验室一般有空调,室内温度高于室外温度,这种情况很少),往往会发现当气温低于 10℃时,在公猪体况、采精设施、处理方法、精液稀释粉、保存方法等都没有变的前提下,放在冰箱内的精液中精子活力很差,死亡率高或全部死亡,或一段时间内与配母猪的返情率很高。这种情况主要是因为猪场人工授精用的恒温冰箱(特别是我国南方地区),一般只有制冷作用,而没有升温功效,当气温低于 10℃时,冰箱失去作用,箱内温度低于精液保存所需要的最低 14℃,时间一长,造成大部分精子因低温而应激死亡。

措施:有条件的猪场,最好在实验室安装具有冷热功能的空调;不行的话,在原有冰箱的基础上安装一个制热设备,当温度降低到一定程度时会自动升温。无论哪种方式,冰箱内的温度始终都要掌握好,这样才能及时采取措施,尽量调整到 16~18℃,以保证精子需要的最佳温度。

3 场内灭鼠

如果算密度的话,与其他行业相比,猪场老鼠的密度应该还是比较大的。大量老鼠长期存在的危害性,一是浪费饲料,二是容易传染疾病,三是物品损坏、屋顶漏水,后果有目共睹。但很多猪场不注意灭鼠工作,或灭鼠没有规律,发现老鼠较多时才处理,造成的隐形损失很大。

老鼠的繁殖力强,一般一年生产 2~5 次,多的达 6~8 次,如果按一年灭鼠 2~3 次的方法灭

鼠,对鼠群数量影响不大。现在社会上有一种每月灭鼠一次的方法,对老鼠的正常生长周期破坏性大,效果显著。

4 猪舍设计

猪舍建筑的设计,经过三十年来的引进、吸收和摸索,已经日趋完善了,逐步达到了符合猪只生理特点要求、管理操作方便、成本低而利用率高的目的,但由于国内大部分养猪业发达的地区土地比较紧张,猪舍的建筑密度也越来越大;能源日趋紧张,猪场费用也越来越多;环保要求不断提高,对猪场来说压力也越来越大。针对这些情况,很多大型猪场已经采取了一些有效的措施并且取得了明显的效果,对于小规模猪场次,在猪舍建筑设计方面也可以采取一些措施,使猪舍的采光、节能、环保工作更加合理。

措施:设计新猪舍时,前后瓦顶隔一段距离(5 m左右)各留一个(1×1) m²的空,装上无色的玻璃,以增强猪舍的透光性;猪舍瓦面用内层是泡沫或海绵的双层彩铁瓦(有的直接铺木板,上面再盖瓦)覆盖,特别是分娩舍和保育舍,可以把大功率的保温

灯换成小的(如果能利用本身猪场沼气保温,节约将更加明显)冬天保温效果比较显著,由于隔热好,夏季也不会太热,可以节约保温或降温的能源;环保方面,猪舍粪沟设计时可以把猪尿与粪水分开单独排出,这样可以减少污水处理的压力。

5 死猪无害化处理

丢弃死猪现象在养猪界特别是散养场户中存在。死猪到处丢弃,一方面污染了周围的环境,使得污水横流,臭气熏天,更加容易引发疾病,危害人民身体健康;另一方面,对生产场声誉影响不可估量。缺乏社会公德,于人于己都有害。

作为生产场,从公众利益考虑,一是要禁止死猪(不论大小)出场,更不用说直接销售赚钱了,很多买主是打着买回去喂鱼的幌子但却有其他目的;二是要在场内进行严格的无害化处理:挖坑深埋或火化炉火化。在场内远离生产区、生活区和水源的地方,挖深2~3 m的坑(大小可以根据饲养规模定),四周用砖砌墙,下面铺水泥,上面盖水泥盖。将死猪、胎衣等放进去,一段时间撒一些石灰或烧碱,促进溶解。

欢迎订阅

《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)

(1976年创刊,大16开本,正文52页)

主管单位:广东省农业科学院

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

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

订 价:每期定价5.5元,全年33.00元(含平寄邮费)。

订阅方式:本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

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

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

广东畜牧兽医科技 (双月刊)

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

2009年第34卷第1-6期(总第143-148期)

· 牧业论坛 ·

- 我国动物福利立法探讨.....林利明, 吴松浩, 等(5-3)
- 当前生猪生产现状调查及后期走势判断.....
.....虞丽娜, 陈光亚, 等(5-5)

· 专题综述 ·

- 畜禽粪便污染及其治理技术进展.....
.....何逸民, 冯春复, 等(1-3)
- 微量元素锰在动物营养中的应用研究.....
.....李勇超, 高凤仙, 等(1-6)
- 猪几种氨基酸需要量研究进展.....
.....郭万华, 刘亚娟, 等(1-9)
- 鸭瘟病毒的研究进展.....董嘉文, 黄永亮, 等(1-12)
- 中草药在兔大肠杆菌病防治中的应用.....
.....李雪, 郭世宁, 等(1-15)
- 禽流感病毒神经氨酸酶的研究进展.....
.....任丽伟, 陈强, 等(2-3)
- 浅谈三聚氰胺的毒性及其在饲料中的检测方法.....
.....田树清, 范艳平(2-7)
- 中草药防治奶牛乳房炎的研究进展.....
.....龚平阳, 肖兵南, 等(2-9)
- 抗菌肽的生物活性及在畜牧生产中的应用前景.....
.....刘德辉, 徐蕙(3-3)
- 微量元素锌在仔猪饲养中的应用.....
.....刘艳芬, 杨文英, 等(3-6)
- 植酸酶在家禽饲养中的应用.....吴宗明, 张彬(3-9)
- 肉鸡腹水综合症的营养调控.....赵必迁, 周安国(3-12)
- 基因打靶技术的研究概况.....彭礼繁(4-3)
- 维生素D生物功能的新进展.....
.....杨宽民, 蒋宗勇(4-8)
- 细胞高密度培养关键技术研究进展.....
.....蔡植松, 齐冬梅, 等(4-11)
- 规模化猪场抗菌药物的正确使用.....
.....王斌斌, 温黎俊(5-9)
- 玉米蛋白粉的质量及其在畜禽饲料中的应用概况.....
.....晏家友(5-12)
- 环介导等温扩增技术在动物病原检测中的应用.....
.....何玲, 罗满林, 等(5-14)
- PCR-DGGE技术及其在微生物群落结构研究中的应用.....
.....罗佳捷, 李丽立, 等(5-17)
- 半胱胺对动物机体的免疫调节及抗氧化作用的研究
进展.....洪军, 胡建业, 等(5-20)
- 多西环素的药理学进展及临床应用概述.....

-李伟, 杨阳(6-3)
- 猪瘟兔化弱毒疫苗的研究概况.....
.....吴文福, 岑小清, 等(6-6)
- 奶牛亚急性瘤胃酸中毒的发生与危害..... 谿银强(6-9)
- 畜禽养殖场空气污染的营养性防治对策.....
.....孙利娜, 谷子林, 等(6-12)

· 畜牧技术 ·

- 推进生猪“四化”建设 提高养猪效益 - 沪、浙、粤生
猪产业化考察启示.....赖贻奎, 董国鲜, 等(1-17)
- 浅谈牛人工授精中应注意的问题及解决方法.....
.....刘瑞鑫(1-21)
- 影响小规模猪场正常发展的主要原因分析与改进措施
.....吴同山, 李旭金, 等(2-12)
- 波尔山羊与本地白山羊杂交改良试验.....刘东军(2-14)
- 笼养种鸡产蛋期饲养管理要点.....
.....王锐彬, 朱燕秋, 等(3-16)
- 规模化猪场免疫谱与免疫程序的制定原则.....
.....温黎俊, 王斌斌(3-18)
- 营养因素对奶牛繁殖性能的影响及提高繁殖率的措施
.....陈熠, 贺建华(3-21)
- 矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡产蛋性能比较研究.....
.....张国杭(4-14)
- 规模化猪场保育猪的生产管理技术.....
.....刘世强(4-16)
- 珍禽——孔雀的饲养前景广阔.....
.....毕小艳, 张彬(4-18)
- 惠州某猪场繁殖成绩分析.....李彦超(5-23)
- 桂牧一号杂交象草对奶牛生产性能影响的试验.....
.....黄香, 文信旺, 等(5-27)
- 伟德山土著菌对育肥猪生产性能的影响.....
.....王霞光, 陈丽芳, 等(5-29)
- 韶抗母猪生殖应激剂和抗仔猪断奶应激剂对断奶仔猪
血清乳酸脱氢酶同工酶的影响初探.....
.....陈琼, 廖三赛, 等(6-16)
- 娟姗牛在广西的繁殖性能初报.....
.....刘瑞鑫, 吴柱月, 等(6-19)

· 兽医临床 ·

- 副猪嗜血杆菌病的病理组织学观察.....
.....张清华, 付强, 等(1-22)
- 雏鹌鹑葡萄球菌卵黄囊感染报道.....
.....张贻传, 邓舜洲, 等(1-23)

鸡腺胃型传染性支气管炎的实验病理学研究.....
魏昆鹏, 郭万华, 等(2-16)

鸡肺石蜡切片 AgNOR 染色方法的探讨.....
曾健滢, 冯宇麟, 等(2-19)

中西医结合治疗亚洲黑熊肝硬化继发腹水症.....
李纪春, 陈武, 等(2-21)

一例仔猪水肿病的诊断... 魏昆鹏, 郭万华, 等(3-24)

浅谈规模猪场母猪子宫内膜炎的防治.....
伍树松, 李朝军(3-26)

一例孟加拉虎慢性肾炎的诊治.....
李纪春, 夏晓潮, 等(3-27)

广东省部分猪场副猪嗜血杆菌的分离与鉴定.....
姚晓辉, 陈芳艳, 等(4-20)

新疆石河子地区隐形乳房炎病原菌的分离鉴定和
 药敏试验.....刘东军(4-22)

一例鸡球虫病的诊断报告.....
魏昆鹏, 郭万华, 等(4-24)

金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定和药敏实验.....
宋德平, 朱芝秀, 等(4-26)

生猪“瘦肉精”残留的危害及防治对策.....
邹淑当, 卢沛炯, 等(4-29)

猪病毒性腹泻的防制措施.....李中兴, 毛雪红(5-30)

孔雀大肠杆菌病的防治体会.....刘东军(5-31)

犊牛大肠杆菌病的诊治报告.....
黄伟明, 张国军, 等(6-21)

几种常用激素在母牛繁殖中的使用方法探讨.....
欧聚寿, 李铭, 等(6-22)

做好山区农村高致病性禽流感防控工作的主要对策..
宋玉胜(6-24)

·试验研究·

肉种禽网状内皮增生症、鸡传染性贫血和禽白血病
 血清学调查.....胡北侠, 黄艳艳, 等(1-25)

副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立.....
张欢, 侯佳蕾, 等(1-28)

H₃N₂ 亚型猪源流感病毒 NS 基因的克隆与序列分析..
李敏, 向华(1-31)

副猪嗜血杆菌 PCR 快速诊断方法的建立.....
张盼锋, 仇微, 等(1-33)

三种猪 I 型干扰素基因的克隆与序列分析.....
周庆丰, 陈丽, 等(1-37)

银翘散对鸭肝脏生化功能的影响试验.....
黄炳根, 岑锐坤, 等(1-41)

培养液磷含量和 pH 值对鸡离体小肠磷吸收的影响...
徐运杰, 方热军, 等(2-23)

樱桃谷鸭白介素 18 基因的克隆与原核表达.....
龚朋飞, 周庆丰, 等(2-28)

猪源流感病毒 NS1 基因的克隆及原核表达.....
李敏, 向华, 等(2-31)

圆环病毒 2 型人工感染猪的排毒情况及体内分布规律
 的初步研究.....何逸民, 罗玉均, 等(2-35)

复方长效土霉素注射液的工艺研究及疗效试验.....
朱斌, 李龙瑞(2-38)

仙湖肉鸭配套系 F₁₃ 代繁殖性能的观测与分析.....
吕敏芝, 刘绍扬, 等(3-29)

京海黄鸡公鸡性行为的观察研究.....
王亮, 徐爱秋, 等(3-32)

珠三角地区几例伪狂犬病猪的组织病理学观察.....
郭铭生(3-36)

鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定.....
齐冬梅, 赖月辉, 等(3-39)

伪狂犬病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立.....
田云, 任裕其, 等(4-31)

不同时期 H₅N₁ 病毒的 HA 和 NA 基因进化树及基因变异率
 线性回归分析.....潘德敏, 江经纬, 等(4-34)

猪瘟病毒 RT-LAMP 实验诊断初报.....
曾小娜, 刘中勇, 等(4-38)

新型鸭肝炎病毒 FS 株全基因组序列分析.....
何冉娅, 孙伟, 等(5-34)

中药双联法治疗鸡传染性喉气管炎的研究.....
陈庆勋, 孙凌志, 等(5-39)

鸭病毒性肝炎精制蛋黄抗体保存期的测定.....
史大庆, 陈君彦, 等(5-41)

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光定量
 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立.....
孔留五, 张桂红, 等(6-25)

LUXTM 荧光 PCR 快速检测沙门氏菌的研究.....
许如苏, 陈茹, 等(6-30)

四种兽用抗生素的体外抑菌效果评价.....
宋德平, 谢勇飞, 等(6-35)

白介素 -15 真核表达质粒对猪瘟免疫增强效果的研究
夏芳, 罗满林, 等(6-38)

野生草食动物源多杀巴氏杆菌荚膜分型的研究.....
夏晓潮, 苏力, 等(6-40)

·宠物园地·

犬支持细胞瘤引起双侧睾丸多发性囊肿一例.....
吴仲恒, 庄瑞宏, 等(1-44)

犬胃扩张 - 扭转综合征... 张洋, 陈瑞, 等(1-46)

四种手术方法治疗犬髋关节脱位的效果比较.....
周庆国, 黄毅, 等(2-40)

犬肾结石合并膀胱结石一例及其分析.....
陈瑞, 王飞, 等(2-43)


犬皮肤病的诊断与防治措施.....

.....李成梅, 古飞霞, 等(2-45)
 宠物手术病例及相关问题剖析.....林小梅(3-42)
 东莞市石碣镇防控狂犬病的对策和成效.....
李月文, 黎国辉, 等(3-44)
 狂犬病抗体水平检测方法综述.....
共, 杨洪全, 等(3-46)
 氯芬黄敏片引起犬的胃损伤的临床及组织学观察.....
庄瑞宏, 吴仲恒, 等(4-41)
 一例犬胸壁透创的救治报告.....
毛天翔, 张忠传, 等(4-43)
 犬的疫苗与接种问题.....郭淑萍(4-44)
 不同缝合材料与方法在犬膀胱切开术中的应用效果...
张丽, 林玉萍(5-43)
 犬的硬膜外麻醉.....刘吉贞, 熊惠军(5-46)
 几种常见犬感染性血液病的诊治体会.....
张丽, 周方军(6-43)
 犬胸段食道异物阻塞经胃切开手术治疗一例.....
谭志文, 余殷兴, 等(6-46)

·经验交流·

奶牛子宫内膜炎的治疗方法及其效果比较..刘东军(1-48)
 牛附红细胞体病与焦虫病混合感染的诊治.....

.....周金亮, 高影凝, 等(1-50)
 浅谈黑山羊的饲养与管理..罗西就, 邓国乐, 等(1-52)
 关于完善能繁母猪保险政策的思考.....颜卓友(2-48)
 非洲狮附红细胞体病的诊治.....
彭仕明, 吴智斌, 等(2-50)
 一例疑似猪水肿病的诊疗.....温青泉, 罗英娇(2-52)
 雏鸡呼吸困难原因的探讨及控制对策.....
孔意端, 陈峰, 等(3-49)
 浅谈东莞市动物疫病防控工作存在的问题及对策...
胡就成(3-51)
 山羊养殖须把好“五关”.....周志可, 谭武强(4-45)
 一起猪链球菌病和伪狂犬病的混合感染的诊治.....
麦康荣, 林伟明(4-47)
 浅谈中西医结合治疗牛青桐叶中毒病的体会.....
李天海(4-49)
 奶牛子宫蓄脓的治疗体会..刘瑞鑫, 罗鲜青, 等(4-51)
 一起兔瘟的诊断报告.....温娟, 黄苑, 等(4-52)
 四川会理驴的资源情况与保护利用.....李天海(5-49)
 中西医结合治疗耕牛下痢..唐亮华, 刘云飞, 等(5-51)
 以循环经济促畜牧业可持续发展.....汤道玲(6-48)
 猪场容易忽视的几个问题.....吴同山(6-50)



大北农集团
DA BEI NONG GROUP

20万招聘精英

福州大北农生物技术有限公司是北京大北农集团下属的子公司, 集产品研发、生产、销售和服于一体的高新技术企业, 并以“为动物生产提供一流生物制品和疫病预防解决方案”和“生产免疫保护力更强的动物疫苗”为宗旨。公司重点产品“诸稳康(猪瘟脾淋弱毒疫苗)”、“伪狂静(猪伪狂犬弱毒疫苗)”、“囊盾(鸡传染性法氏囊炎弱毒疫苗)”和“领风(鸡毒支原体弱毒疫苗)”已在用户心中树立了良好的品牌形象。

公司以“人是北农发展的唯一资源”, 提供充分展示自己才华的争创第一的事业舞台、充分信任充分授权的创业氛围、系统完善的培训、股权激励、健康的生活方式与成功的工作方法、具有相对竞争力的薪资待遇。福州大北农特向全国各地招聘380名专业技术人员, 其中管理人员20名, 产品研发人员30名, 生产技术人员50名, 技术服务经理50名, 大客户经理50名, 技术营销专员180名。

畜产品部: 游仁华 13809511690
 禽产品部: 赵张利 13393051093
 人力资源部: 林琼 0591-83646376(O)、0591-83628994(F)
 公司网址: www.fzdbn.com
 E-mail: fzdbnhr@yahoo.com.cn
 公司地址: 福建省福州市晋安区东门外园中村110号
 邮编: 350014