

# 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 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 岑俏梅

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

林旭野

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

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:4月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

# 目 录

## · 牧业论坛 ·

食品出口与检验检疫.....许如苏, 纪 强, 等(3)

## · 专题综述 ·

猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展.....张 欣, 崔 敏, 等(7)

中药免疫调节作用的研究进展.....仇微红, 郭世宁, 等(9)

生物标志物的研究进展.....吴晓薇, 黄国城(14)

## · 畜牧技术 ·

仔猪缺铁性贫血的成因及综合预防措施.....周汉柱(19)

营养物质对仔猪免疫力的影响.....田树海(21)

## · 兽医临床 ·

一起雏鹅大肠杆菌病的诊治报告.....董军成(25)

灰狼股骨骨折治疗报告.....成世清, 王 静, 等(27)

## · 试验研究 ·

广东省猪蓝流行野毒 E2 基因的扩增及其序列分析.....

.....邓雨修, 宋延华, 等(29)

牛环形泰勒氏焦虫疫苗生产用培养基的筛选.....鲁立柱, 王 延, 等(33)

两株死胎源猪圆环病毒 II 型的分离与序列分析.....

.....周庆丰, 陈 峰, 等(36)

小鼠体内卵母细胞死亡的形态变化研究.....彭礼繁, Eun-A LIM, 等(40)

猪链球菌病灭活疫苗(2型, HA9801株)的研制.....

.....游启有, 杨 球, 等(44)

## · 宠物园地 ·

不同缝合材料与方法在犬小肠肠管吻合术中的应用效果观察.....

.....周庆国, 李 蕾, 等(46)

一例犬乳房放线菌病例的诊断报告.....周善英, 潘咏梅(50)

一例犬瘟热的输血诊疗体会.....张煜坤, 陈展飞, 等(52)

## · 信息之窗 ·

加强兽药行业管理 促进养殖业健康发展.....(6)

发改委农业部联合发文 养猪最高补助 100 万.....(13)

农业部卫生部举行部际联席会议 研究共同加强疫病防控和食品质量安全工作

.....(26)

农业部开展兽药市场专项整治行动.....(28)

粤召开全省《动物防疫法》培训班 部署重大动物疫病防控工作.....(35)

2008“永顺杯”优秀论文评选启事.....(39)

今年前两个月广东猪肉进口大增.....(51)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2008 Volume 33,Number 2 (Total No.138)

---

## Main Content

- Food's export and its inspection and quarantine* .....Xu Rusu, Ji Qiang, et al (3)
- Research progress of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome vaccine* .....Zhang Xin, Cui Min, et al (7)
- Research progress on the immune regulation function of Chinese traditional medicine*.....Qiu Weihong, Guo Shining, et al(9)
- Research progress on biological markers*.....Wu Xiaowei, Huang Guocheng(14)
- Cause for piglets' iron deficiency anaemia and the prevention measures to it*.....Zhou Hanzhu(19)
- The influence of nutrition on piglets' immunity*.....Tian Shuhai(21)
- Diagnosis and treatment of acase or the young geese colibacillosis* .....Dong Juncheng(25)
- Treatment of one lobo's thighbone fracture*..... Cheng Shiqing, Wang Jing, et al(27)
- Amplification and sequence analysis of E2 gene of prevalent virulent strains of classical swine fever virus from  
Guangdong province*.....Deng Yuxiu, Song Yanhua, et al (29)
- The selection of the culture medium for the production of bovine theileria anulata vaccine*..... Lu Lizhu, Wang Yan, et al (33)
- Isolation and sequence analysis of two porcine circovirus type 2 viruses isolated from abortion fetuses*.....  
.....Zhou Qingfeng, Chen Feng, et al (36)
- Phenotypic study of murine oocyte's death in vivo* .....Peng Lifan, Eun-A LIM, et al (40)
- Study of inactivated vaccine(strain HA9801) against Suis Streptococcus type 2 disease* .....  
.....You Qiyou, Yang Qiu, et al (44)
- Application effect of using different stitch materials and methods in the operation of canine small intestine's anastomosis*  
.....Zhou Qingguo, Li Lei, et al(46)
- Diagnosis of one case of canine breast actinomycosis*..... Zhou Shanying, Pan Yongmei(50)



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

# 食品出口与检验检疫

许如苏, 纪强, 郭奕亮  
(汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 515041)

中图分类号: S851.347

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0003-04

随着贸易全球化的发展和经济战的升级, 食品安全成为各国尤其是发达国家控制产品进口的重要贸易技术壁垒。随着我国经济的持续高速发展, 食品及农副产品出口量迅猛增长, 引起了欧美等发达国家的高度关注。为限制对中国食品的进口, 各国纷纷扩大我国出口食品的安全问题, 甚至不惜制造中国食品威胁论, 严重损害了我出口企业的利益, 引起了中央的高度重视, 促发了一场声势浩大的食品安全专项整治活动。究竟我国出口食品情况如何? 检验检疫部门又如何应对呢? 下面就此进行论述。

## 1 我国食品出口的基本情况

近几年来, 虽然发达国家利用个别食品安全事件大做文章, 对我出口食品进行围追堵截, 但我国出口食品的货值依然节节攀升。据商务部统计, 2006年食品出口金额266.6亿美元, 同比增长16.0%; 其中对日本出口74.0亿美元, 同比增长16.0%, 对欧盟出口33.2亿美元, 同比增长31.8%; 对美国出口33.6亿美元, 同比增长36.4%。日本、欧盟和美国三大市场占了出口食品52.4%的份额。据广东CIQ统计, 2006年出口食品29.29亿美元, 同比增长64.2%; 2007年1-9月, 出口食品24.18亿美元, 同比增长10.5%。近几年我出口食品的质量合格率都在99%以上, 2006年, 我国出口食品总体合格率达到99.89%, 证明我国出口食品质量安全是有保障的。

## 2 食品安全被国外媒体蓄意炒作, 成为食品出口的相互制约因素之一

2007年3月, 美国宠物食品“三聚氰胺”事件发生后, 美国媒体大肆渲染我国食品安全问题, 由点到面不断扩大不良影响, 先后炒作鲶鱼药物残留事件、冷冻鱼致人中毒事件等。由于受美国媒体

的影响, 欧盟、加拿大、新加坡、日本、南非、越南、马来西亚等国的一些媒体也参与其中, 反复报道我国出口牛肉、水果、水产品等产品存在质量问题, 妄加评论, 故意制造中国商品威胁论, 把中国商品妖魔化。从而导致以美国为主的一些国家对我国的出口食品采取限制进口的措施, 如美国对我国出口的所有植物性蛋白采取扣留检验措施, 对中国水产品实施封杀。美国FDA的封杀令引起了其它国家的连锁反应, 各国不断扩大对我国产品的制裁。如韩国发出通报加强对我国出口水产品的药残检测。日本对鳗鱼的检测要求, 从25项提高到116项, 将恩诺沙星类检测限从0.1 mg/kg调整到0.01 mg/kg等。传媒大肆炒作的结果导致国外消费者购买中国食品的数量减少, 中国出口产品积压, 严重损害了我国出口企业的利益。

国外媒体恶意炒作的企图有两个: 一是利益集团既得利益的需要。利益集团对我国产品出口额倍增深感不安, 担心冲击其既得利益和既有秩序, 有意在容易引起公众关注的食品和消费安全上作文章, 损害“中国制造”的声誉及我国形象, 牵制我国经济发展进程, 同时增加在政治经济问题上与我国讨价还价的筹码。二是政党利益之争的需要。美国民主党掌握国会后, 贸易保护主义势力上升, 相关利益集团极力推动政府对境外产品采取限制措施。美国大选临近, 贸易问题牵动美国就业形势和经济竞争力, 成为美国内政治敏感话题和大选重要议题, 各派政治势力竞相加以利用。一些政党为拉选票, 首先把中国作为攻击目标, 把制裁中国作为其政策的首选, 刻意在中国产品的质量上作文章。

## 3 影响我国食品出口一些制约因素

### 3.1 我国食品安全整体水平偏低, 存在较多安全

**隐患** 我国食品标准体系陈旧且不健全, 对有毒有害物质的要求过于宽松或根本就没有, 与发达国家差距很大, 致使我国的食品安全整体水平偏低, 可靠性不强。加上存在制假售假现象, 重大质量安全事故时有发生。虽然出口食品的企业已经检验检疫部门注册登记并接受检验检疫的监管, 食品出口企业整体水平相对较高, 但有的企业仍存在自检自控体系不完善、自律意识不强、不按标准生产、不能持续满足卫生注册要求等情况。种植养殖源头的疫病控制和农兽药使用不规范, 导致残留问题尚未得到彻底解决。一些企业守法意识差, 诚信意识淡薄, 见利忘义, 掺杂使假, 逃避检验检疫监管, 导致出口食品被国外检出有毒有害物质时有发生。

**3.2 国内检验检疫监管工作存在薄弱环节** 一是从源头监管的工作难度大, 尚未能完全到位。二是企业逃避监管的现象严重。三是国内外产品质量标准存在较大差异。近年来, 日本、欧盟等主要食品进口国大幅提高农兽药残留检测标准, 有些标准几十、几百倍地严于我国。如日本“肯定列表制度”对 797 种农业化学品设立了 53 862 项限量标准, 而目前我国仅制订了 234 种农兽药的 1 136 项限量标准。日本标准严于我国的就有 120 种、622 项之多。四是检验检疫及监管模式存在缺陷, 尚不能完全适应贸易发展的需要: (1) 检验检疫方式不够科学, 缺乏针对性。(2) 检验项目的设定与应对技术贸易壁垒的要求不完全相符。(3) 部分项目的检验水平相对落后。

**3.3 发达国家不断增加和更新技术标准和技术法规, 产品质量标准不断升级** 欧盟、日本和美国等发达国家以食品安全和环境保护等名义不断增加和更新技术法规, 目的在于为进口产品设置合理的贸易技术壁垒。美国每 6 年更新和整理一次法律体系。欧盟近几年出台了一系列指令, 以适应不断出现的食品安全卫生问题。如 2006 年 1 月 1 日起实施新的《欧盟食品及饲料安全管理法规》, 增加了食品生产过程中的可追溯管理, 强调了食品尤其是动物源性食品的身份鉴定标识与健康标识。2006 年 5 月, 日本厚生省出台了《肯定列表制度》, 对进口食品提出了极其苛刻的安全卫生要求。韩国则利用检验检疫法规和苛刻的产品质量标准, 对我国出口水产品实施“先精密仪器检查

后通关”的模式, 以此延缓通关速度, 增加产品成本, 降低产品的市场竞争力, 从而达到限制产品进口的目的。

由于发达国家实施的食品安全卫生法律法规严于我国相应的法律法规, 导致我出口食品常常处于被动挨打的局面。往往是刚刚搬掉绊脚石, 又来了拦路虎。

**3.4 国外食品标签和包装要求越来越高** 近几年, 发达国家不但提高产品的检验标准, 而且对包装用材的卫生标准和标签标识提出了更严格的要求, 对包装的检验标准由原来的几项、十几项增加到现在的几十项, 已构成了“包装技术壁垒”。美国是世界上对食品标签要求最严格的国家之一, 食品标签多达 22 种, 且逐年修订补充。日本对食品标签或标识标准也作了大面积的修订, 涉及面广且要求严格。韩国和欧盟对食品包装也有非常具体而严格的要求, 对水产品的包装甚至具体到生产方式和捕捞区域。

近年来, 食品包装问题日益凸显, 已对我国出口食品产生一定的影响。据报道, 我国出口水产品因标签不合格而造成的经济损失高达 70 亿美元。

**3.5 国外检验检疫程序过于严格** 美国进口食品由食品安全检验局 (FSIS) 和食品药品监督管理局 (FDA) 负责。FSIS 负责美国进口肉、禽和大多数蛋产品的检验检疫, 采取文书审查、现场稽查和到岸再检验三项措施来保障进口肉、禽和蛋产品的食品安全, 而输出国必须首先获得 FSIS 的批准方可向美国出口产品。食品药品监督管理局 (FDA) 负责美国进口其他食品的检验检疫, 采取企业注册、进口预报和到岸检验三项措施来保障食品的安全性。日本对进口食品的检查采取“监测检查”和“命令检查”。“监测检查”是对一般进口食品的一种日常抽查, “命令检查”则是强制性的批批检查, 检查费用由企业承担。如果“监测检查”发现一次违规, 则抽检率提高 50%, 出现第二次违规则启动命令检查。如同一企业被多次启动命令检查, 则该企业将被列入黑名单, 被禁止向日本出口食品。

**3.6 认证注册制度已成为食品进口首道门坎** 欧美禁止未实施 HACCP 的水产品和肉类食品进口, 强制性要求所有出口美国的水产品和肉类产品加工企业必须实施 HACCP 计划和获得 HACCP 认证, 并在美国、欧盟注册, 还不定期派员到注册企

业检查。美国对植物源性食品虽未实施认证,但也对盐渍类要求低酸食品预先注册及加工过程予备案。韩国也对出口水产品企业实施登记和注册管理。日本虽未对出口食品生产企业全面实施备案注册制度,但对我国出口鳗鱼也实行备案管理,要求建立并严格执行产品质量安全标准体系。

**3.7 动物福利开始显现** 动物福利在英美等发达国家早已司空见惯,美国、欧盟、加拿大、澳大利亚等经济发达国家已为动物福利立法。早在几年前,世界动物卫生组织(OIE)已将建立动物福利标准列入议事日程予以研究。虽然目前动物福利对食品贸易的影响尚不太明显,但已受关注。动物的人道屠宰,运输和饲养密度将首当其冲,应引起足够重视。

## 4 我国检验检疫部门的应对措施

**4.1 从源头抓产品质量,对出口食品原料种养植基地实施备案,对食品加工企业实施卫生注册登记管理** 检验检疫部门对出口食品原料种养植基地已全面实施备案登记制度,先后出台了《出入境粮食和饲料检验检疫管理办法》、《进出境蔬菜检验检疫管理办法》、《出境水果检验检疫监督管理办法》、《出口食品生产企业卫生注册登记管理规定》、《食品生产加工企业质量安全监督管理办法》、《食品生产加工企业质量安全监督管理实施细则(试行)》等一系列管理办法和相关规定,大力推行“公司+基地+标准化”生产管理模式,不断规范种养植和食品加工过程。

**4.2 检验检疫关口前移,对种养植和加工过程实施全过程监控** 近几年来,检验检疫监管模式有了很大进步,由原来对终产品的检验检疫放行到目前的从源头、生产加工到成品的全过程监控,大大提高了监管的有效性和工作效率,节约了检验检疫资源,服务了企业,使企业受益匪浅。一是发现问题能及时解决,减少产品的残次率,从而降低了产品的成本;二是减少成品的抽查比例,加快了通关速度。

**4.3 实施产品追溯和不合格品召回制度** 一是大胆创新,积极开展电子标签应用技术研究。目前已将电子标签应用于供港活猪检验检疫监管和出口烤鳗检验检疫监督管理中,取得良好效果,为开发研制全国标签备案系统提供了宝贵经验。二是对出口食品运输包装100%加施检验检疫标志,打

击逃避检验监管。三是对出口食品全面实施电子化监管。实现了产品可追溯,对不合格产品实施召回制度,有效地增强了企业质量意识,促进了产品质量的提高。

**4.4 按进口国产品质量要求实施检验检疫,避免不合格产品流出国门** 鉴于国内食品标准较落后,对有毒有害物质的限量标准比发达国家低,而各国的食品标准也有所不同,尤其对有毒有害物质的限量标准更是存在差异。因此,检验检疫部门根据进口国的产品质量标准和检验检疫要求,通过风险分析来确定出口不同国家不同产品的检验项目进行检验,在确保产品质量的前提下避免检验资源的浪费和产品成本的提高。

**4.5 加强诚信体系建设** 为强化企业产品质量第一责任人的意识,促进企业形成自我管理、自我约束、自觉诚信经营及优胜劣汰的良好机制,检验检疫部门全面实行出口企业质量承诺和红黑名单制度,在总局网站设立“进出口食品风险预警”和“进出口食品企业黑名单”专栏,将违规企业、出口食品被国外检出问题进行通报或召回的企业列入“黑名单”,并采取暂停出口直至取消出口资格等措施;同时对诚信经营、出口食品长期“零事故”的企业给予“绿色通道”待遇。

**4.6 实行通关单联网核查及全申报制度** 为了进一步打击瞒报、逃漏检疫行为,维护检验检疫法律尊严,真正实行“先报检,后报关”,严密监管,严把国门。检验检疫部门出台了两项重要措施:一是和海关总署联合发布公告,自2008年1月1日起对法定检验进出口商品实行通关单联网核查制度;二是对出入境货物实施全申报制度,构建一个严密的监管体系。

**4.7 严厉打击违法行为** 一是依照《国务院关于加强食品等产品安全监督管理的特别规定》,对未按照法定条件、要求从事生产经营活动的,生产者生产产品所使用的原料、辅料、添加剂、农业投入品不符合法律、行政法规的规定和国家强制性标准的等行进行严厉惩处;二是加强对代理报检公司的管理,规范报检行为;三是严厉打击买卖检验检疫证单、换货、夹藏、瞒报、逃漏检疫等违法行为,加大行政处罚力度;四是加强执法稽查和过错追究工作,规范检验检疫监管。

**4.8 强化反制措施的运用** 检验检疫部门在加强

对出口食品质量监控的同时,密切关注国外食品生产动态,及时跟踪国际产品质量标准和检验技术标准,加大对实验室的规划与投入和检验标准的制修订,加强实验室的能力建设,不断提高实验室的检测技术水平。同时加强对进口大宗敏感商品的检验检疫把关,通过引入风险分析,有针对性地选择监测项目,增加抽样比例,严格抽样程序,来提高检出率,从而增加贸易谈判的筹码,为反制发达国家设置的贸易技术壁垒提供技术支持。

#### 参考文献:

- [1] 郭建红, 吴松浩, 高丽芳. 进出口动物产品技术性贸易措施的现状及对策研究[J]. 科技兴检, 2007, (9): 60-62.
- [2] 鲍佳生, 赵丽莎. 我国出口食品遭遇的技术性贸易壁垒及对策分析[J]. 科技兴检, 2007, (9): 57-59.
- [3] 张德云, 郑映钦. 国际贸易技术壁垒对水产品的影响和应对措施[J]. 科技兴检, 2007, (9): 89-92.
- [4] 陈滢. 举全局之力, 打好产品质量安全监管仗[J]. 科技兴检, 2007, (4): 5.
- [5] 肖前, 关迪峰, 童松青, 等. 以公共管理视角分析技术性贸易壁垒问题[J]. 科技兴检, 2007, (9): 1-25.

### 加强兽药行业管理 促进养殖业健康发展

2008年是全面贯彻落实党的十七大战略部署的第一年,是改革开放30周年,也是北京举办奥运会之年。我们启动“优质兽药出厂放心兽药入户”行动,对于全面促进加强兽药行业管理工作,保障奥运会动物产品质量安全十分必要,也非常及时。

近年来,按照党中央、国务院部署,在农业部党组正确领导下,兽药行业管理工作取得明显成效,为农业和农村经济又好又快发展做出了积极贡献。同时,我们也面临着更加艰巨的任务。一方面,我们必须确保奥运会期间动物产品供应和质量安全,力争在奥运会期间不发生重大动物疫病疫情和重大动物产品质量安全事件;另一方面,我国南方部分地区发生了罕见的低温雨雪冰冻灾害,对动物疫情的发生和动物产品的供应产生较大影响。进一步加强兽药行业管理工作,对实现重大动物疫病防控目标,保障动物产品有效供给以及质量安全意义重大,责任重大。我们要把握好新形势和新任务,以对国家和人民群众高度负责的态度,全力以赴做好各项工作。

组织开展“优质兽药出厂放心兽药入户”行动,是贯彻落实党的十七大和中央一号文件精神,落实兽药行业管理工作总体部署的重要举措。通过行动带动,要在全行业内形成重质量、保安全、抓监管的良好氛围。各地畜牧兽医主管部门要高度重视,切实加强领导,因地制宜,组织制定本辖区行动方案,并抓好落实,确保行动顺利开展,取得实效。要突出重点、整体推进,突出抓好生物制品生产、兽药流通环节监管和兽药行政执法,严厉打击生产、销售、使用假劣兽药等违法行为。

在全力抓好“优质兽药出厂放心兽药入户”行动落实的同时,我们要以这次行动为契机,立足当前、着眼长远,着力构建加强兽药行业管理长效机制。要建立健全重大动物疫病疫苗生产、监管、储备、调拨、招标等管理制度,保障重大动物疫病防控工作成效。

建立健全兽药安全监管机制,提高动物产品质量安全水平。完善兽药管理法律法规,建立健全兽药行业准入机制和退出机制。强化兽药监管措施,整顿和规范兽药经营秩序。加强兽药管理体系和行业基础设施建设,为长远发展打好基础。加快推进兽药科技创新,增强行业发展后劲。要切实加强对行业发展宏观指导,制定实施兽药行业中长期发展规划。

我们一定要认真贯彻落实党中央、国务院以及农业部党组各项工作部署,扎实推进“优质兽药出厂放心兽药入户”行动,切实履行重大动物疫病防控和动物产品质量安全监管职责,全面加强兽药行业管理工作,为促进养殖业健康发展、保证奥运会成功举办做出积极贡献。(信息来源:农民日报;作者:国家首席兽医师 贾幼陵)

# 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展

张欣<sup>1</sup>, 崔敏<sup>2</sup>, 罗满林<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0007-02

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 (PRRS) 所引起的猪的一种接触性传染病。该病 1996 年在我国初次发现, 从此本病开始蔓延, 并呈地方流行性, 病毒在流行过程中发生变异<sup>[1,2]</sup>。2006 年 6 月, 一种临床症状主要为高热、皮肤发红、高发病率和死亡率为特征的高致病性蓝耳病 (HP-PRRS) 在我国爆发, 给我国养猪业造成了巨大损失<sup>[3]</sup>。美国每年用于防治 PRRS 的费用也高达 5.6 亿美元<sup>[4]</sup>。由于 PRRSV 感染引起的巨大危害, 关于 PRRS 疫苗的研究也逐渐开展起来。目前, 商品化或正在研究的 PRRS 疫苗有以下几类:

## 1 灭活疫苗

灭活疫苗的优点是安全性好。攻毒试验结果表明, 母猪繁殖水平、产仔数、流产率、死胎数、断乳后仔猪存活数等指标都有明显改善。灭活疫苗主要用于预防后备母猪和经产母猪感染 PRRSV 所造成的繁殖障碍。缺点是免疫剂量大、免疫次数多、免疫抗体产生缓慢, 因而不适用于仔猪免疫。有关 PRRS 灭活疫苗免疫效果报道不尽一致, 在应用 PRRS 灭活疫苗时应根据具体情况酌情选用。

灭活疫苗诱导的主要是体液免疫, 难以有效激发淋巴细胞介导的细胞毒效应。因此对免疫增强剂的研究成为热点, 以此来提高疫苗的免疫效果。Zhang 等<sup>[5]</sup>将 CpG ODN 应用于 PRRS 灭活疫苗。试验猪同时接种 PRRS 灭活疫苗和 CpG ODN, 28 天用 vPRRSV-102 流行毒株进行攻毒。试验结果表明, 当注射疫苗中 CpG ODN 含量在 50 ~ 200  $\mu$ g/kg 时, CpG ODN 具有免疫佐剂效应, 这表明 CpG ODN 具有剂量依赖性。当剂量为 200  $\mu$ g/kg 时, 产生的免疫增强效果是长效持久

的。用含有 CpG ODN 的 PRRS 灭活疫苗免疫猪后, 可以抵御强毒的感染, 产生强有力的免疫保护。

## 2 弱毒疫苗

1995 年, Boehringer Ingelheim 公司首次推出商品化减毒疫苗 RespPRRS/Repro, 并获准用于 3-18 周龄仔猪的预防接种。随后, 西班牙、荷兰也推出了商品化的疫苗。在亚洲许多国家正在使用一种改良的弱毒疫苗: Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV, 大规模接种能够有效地控制 PRRS, 并能降低死产率及断奶前 - 生长 / 育成时期的死亡率。

PRRS 弱毒疫苗诱导免疫抗体产生较快, 在减轻 PRRS 临床症状上明显好于 PRRS 灭活疫苗。但 PRRS 强毒和弱毒在猪体内的反应过程是一致的, 弱毒疫苗在提供免疫保护的同时, 还会散播疫苗毒, 使得病毒在猪场内长期存在, 有时还会引起 PRRS 的爆发。Nielsen 等<sup>[6]</sup>发现弱毒疫苗毒力返强现象, 弱毒疫苗的不安全性成为人们关注的热点。

明尼苏达州大学兽医学院正在研究一种改良的弱毒疫苗, 他们利用 Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV 和流行毒株 MN184 为亲本株, 保留了疫苗株 Ingelvac<sup>®</sup> PRRS MLV 完整的复制酶 5' 非翻译区, 替换非结构蛋白 3' 非翻译区, 分别构建了重组病毒 pM-LVORF1/MN184 和 pMN184ORF1/MLV 嵌合体, 在活体试验中拯救出致弱的 rMLV 和 rMN184 病毒。用这两种致弱病毒免疫猪, 两种病毒均能产生符合亲本株的免疫应答。但与 rMLV 相比, rMN184 能够诱导较早和较高的抗体水平。所有的试验数据均表明流行毒株 MN184 的致弱毒株有望用于生产中<sup>[9]</sup>。

单株弱毒疫苗和多株弱毒活疫苗在控制 PRRS 上哪个更安全有效? William 等<sup>[7]</sup>利用 RespPRRS/Repro 单一毒株和 RespPRRS/Repro、

NADC-8、NADC-9、JA-142、NVSL-14、SDSU-73 六株毒株制成单价弱毒疫苗和多价弱毒疫苗进行了试验研究,结果表明,两者均能够有效地刺激机体产生免疫反应,能产生免疫保护。但多价弱毒疫苗免疫的猪只,无论是否攻毒都表现淋巴结肿大,因此在实际应用中是否安全还有待进一步研究。Kritas 等<sup>[8]</sup>将乳酸杆菌经鼻腔给药,然后肌注 Ingelvac PRRS MLV 弱毒疫苗,经鼻腔给药并不能激发免疫应答,但能够增加猪只的体重。

PRRS 活疫苗的使用应取谨慎态度。不同地甚至同一地区猪群的 PRRSV 毒株可能不同,不同毒株疫苗交叉保护力很低。活疫苗存在散毒、持续感染和长期病毒血症的风险,所以有的国家禁用活疫苗。建议使用活疫苗后要严密观测,防疫条件好的阴性重点种猪场在是否使用 PRRS 活疫苗上,应更加慎重。

### 3 基因工程疫苗

随着现代生物学技术的兴起,特别是 DNA 重组技术的出现,为研制新一代的疫苗提供了崭新的方法。目前利用基因工程技术已经和正在研制开发的新型疫苗主要有亚单位疫苗、活载体疫苗、DNA 疫苗、转基因植物可食疫苗、合成肽疫苗、抗独特型疫苗等。对 PRRSV 基因工程疫苗的研究主要集中在亚单位疫苗、活载体疫苗和 DNA 疫苗。

**3.1 亚单位疫苗** PRRSV 各结构蛋白免疫原性的研究已比较清楚。PRRSV 感染猪体后,血清中抗 PRRSV 的免疫球蛋白主要是针对 N 蛋白和 M 蛋白,GP3 虽不能刺激中和抗体的产生,但可对仔猪提供保护,GP4、GP5 和 M 蛋白可产生中和抗体,GP5 比 GP4 产生中和抗体的能力更强。亚单位疫苗及其它新型疫苗的研究多针对这些蛋白。Duran 等用杆状病毒表达系统进行了 PRRS 重组亚单位疫苗的研究,他们将 ORF 2~7 分别插入到重组的杆状病毒的多角体启动子下游,发现此病毒能表达 ORF3、ORF5 和 ORF7。利用表达产物分别免疫妊娠母猪,通过检测断奶仔猪的健康状况以及成活率等指标来证明,ORF3 和 ORF5 表达产物能提供一定的免疫保护。

**3.2 活载体疫苗** PRRS 的活载体疫苗主要有以伪狂犬病毒和腺病毒为载体来表达 PRRSV 的抗原基因。因为它避免了 PRRS 灭活疫苗和弱毒疫苗的

缺陷,可同时启动机体的细胞免疫和体液免疫,而且还可构建多价疫苗,因此成为 PRRS 疫苗的研究热点。

郑其升等<sup>[10]</sup>构建了在 3 个痘病毒启动子调控下共表达 PRRSV GP4、GP5 与 M 蛋白的复制缺陷型重组痘苗病毒 rMVA-GP5/M/GP4。目前的研究资料已证实高滴度的中和效价在抵抗 PRRSV 感染和清除病毒过程中具有重要作用,并与病毒的清除呈正相关,而目前对细胞免疫在抗 PRRSV 感染中的作用尚不清楚。rMVA-GP5/M/GP4 能同时激发很强的体液免疫与细胞免疫,表明该重组病毒是一种很有希望的 PRRSV 新型候选疫苗。

Verheije 等<sup>[11]</sup>以分离的 PRRSV-LV 为亲本株,通过基因突变构建了 3 株 PRRSV 重组病毒: vABV688、vABV707、vABV746。vABV688 将结构蛋白 GP2 中两个氨基酸替换,以提高其在细胞上的生长速度;vABV707 中的 M 蛋白功能区用鼠乳酸脱氢酶替换;vABV746 将 N 蛋白 C-端六个氨基酸缺失。通过动物试验对突变毒株的安全性及免疫保护效力进行检测。对重组病毒的安全性检测结果表明,在整个病毒血症期间,人工突变的部位一直存在。用重组病毒免疫后,再用同源或异源的 PRRSV 攻毒以检测重组病毒的免疫保护性,结果发现,重组病毒免疫组产生的病毒血症比 LV 株免疫组产生的病毒血症持续时间短。将“哨兵猪”再引入攻毒保护试验群,发现 vABV688、vABV707 和 vABV746 组的“哨兵猪”病毒血症持续时间缩短,但所有猪都发生了感染,说明重组病毒可给猪体提供一定的保护,但保护效果不完全。该试验结果给用重组病毒研究 PRRS 疫苗开辟了新的途径。

**3.3 DNA 疫苗** 目前国内外有关 PRRSV DNA 疫苗研究过程中,普遍存在难以诱发较早和较高的抗体水平等问题。为解决这个问题,江云波等<sup>[12]</sup>分别以 PRRSV 修饰型 ORF5 基因及 ORF6 为候选基因,构建了双基因共表达的真核表达质粒。将 DNA 疫苗免疫断奶仔猪,能诱发中和抗体和细胞免疫反应。上述研究结果表明,采用基因共表达策略能够显著提高 PRRSV DNA 疫苗效力,为 PRRSV 新型疫苗的研制提供了有用的数据。Barfoed 等<sup>[13]</sup>将 PRRSV 的七个开放阅读框编码的蛋白制成 DNA

(下转第 20 页)



# 中药免疫调节作用的研究进展

仇微红, 郭世宁, 李志华, 刘晓琳  
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 中药具有免疫促进作用和免疫抑制作用。本文从中药与免疫的关系、中药的免疫促进作用以及中药的免疫抑制作用进行了综述, 为中草药在畜牧兽医业应用提供理论依据, 也为疾病的防治提供参考。

**关键词:** 中药; 免疫调节; 动物

**中图分类号:** S851.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0009-05

中药不仅具有耐药性低、毒副作用和不良反应少等优点, 而且具有免疫调节、抗病毒、改善血液循环、解热镇痛及抗菌消炎等功效。随着分子生物学和免疫学的发展以及免疫实验技术的不断提高, 中草药调节机体免疫作用将得到更加广泛的重视和深入的研究。这些研究成果既为中草药在畜牧兽医业广泛应用提供理论依据, 也为疾病的防治提供参考。

## 1 中药与免疫的关系

免疫是通过免疫系统识别自己和非己成分, 并产生免疫应答排除非己, 维持机体生理平衡。从中医的角度分析即识别异己、排斥异己、保存自己。现代研究发现, 免疫、内分泌、神经三大系统之间通过激素、神经递质、细胞因子等“化学信号”进行密切联系, 从而相互协调、相互制约, 共同维持机体生理平衡。而中医则正是以整体的和谐稳定为核心, 所以说中医的理论 with 机体免疫有惊人的相似之处。

中药作为中医的组成部分, 它对机体免疫具有重要的调节作用。根据中药的散弹理论, 各种中药都是多层次、多途径、多靶点地作用于机体, 识别自己, 排除非己成分, 从而维持机体内环境的稳定, 提高机体免疫力。现代科学研究证明, 中药对机体免疫功能的调节受其剂量、机体的机能状态、药物的不同成分、药物的配伍等多因素影响, 很多中药在不同的条件下, 针对不同的对象, 可显示免疫促进作用或免疫抑制作用。

以中医理论和免疫之间的关系为基础来研究中药对机体免疫的调节作用, 对临床预防和治疗

疾病具有重要的意义。

## 2 中药的免疫促进作用

### 2.1 中药对免疫细胞的促进作用

**2.1.1 中药对淋巴细胞的促进作用** T细胞在机体的免疫防御、免疫调节、免疫监视、免疫修复中有极为重要的作用, 对于机体的自身稳定和免疫平衡至关重要。近年来研究证明鹿茸多糖、党参、人参、白术等有提高T细胞比值、提高吞噬细胞功能等作用。席孝贤等<sup>[1]</sup>发现鹿茸多糖能提高免疫力低下小鼠的T细胞总数及TH、TS百分率和TH/TS比值, 并能协助和促进小鼠淋巴细胞的增殖。注射淫羊藿-蜂胶合剂的试验组雏鸡血液中T淋巴细胞比率和E-玫瑰花环形成率显著提高, 并维持在高水平。其具有显著的促进免疫细胞的分裂、增殖、活化作用, 能加速机体细胞免疫功能的发育完善, 从而增强雏鸡免疫应答能力, 提高免疫效果<sup>[2]</sup>。

B淋巴细胞受抗原刺激分化成浆细胞, 浆细胞产生抗体, 这些抗体不仅存在于血液中, 也存在于体液和B淋巴细胞膜上, 主要功能是参与体液免疫反应。很多补益类中药如黄芪、人参、当归、淫羊藿、菟丝子、黄酮、刺五加等以及清热解毒药金银花、侧柏叶等都具有促进抗体生成作用。胡宇莉等<sup>[3]</sup>研究表明穿心莲能显著提高肉鸡的新城疫HI抗体滴度, 对肉鸡的血清球蛋白产生较显著的影响。吴小丽等<sup>[4]</sup>发现蒲公英能促进小鼠的抗体生成和提高巨噬细胞的吞噬百分率, 具有增强正常小鼠的特异性免疫和非特异性免疫的功能。其作用可能与蒲公英所含的多糖类、

酚酸类及黄酮类生物活性物质有关。储岳峰等<sup>[5]</sup>对家兔注射人参皂甙、黄芪多糖、淫羊藿多糖、蜂胶黄酮和当归多糖后,家兔的HI抗体水平持续升高,而且它们的血清抗体效价显著高于对照组。表明这几种中药可以增强机体的体液免疫。

**2.1.2 中药对红细胞免疫的促进作用** Nelson于1953年发现哺乳动物红细胞具有清除循环免疫复合物的功能;Siegel等证实了红细胞具有免疫粘附的重要功能,并提出了“红细胞免疫系统(RCIS)”的概念。目前已经证实,红细胞有许多与免疫有关的物质(如CR1、CR3、CD58),是血液循环中最重要的固有免疫细胞,具有识别、粘附、杀伤抗原、清除循环免疫复合物(CIC)等多种功能。还发现红细胞可促进T淋巴细胞增殖,使细胞因子如 $\gamma$ -干扰素释放量增加,增强B淋巴细胞特异性抗体应答能力。所以红细胞具有对白细胞系统的免疫调节机制。

多种补益气血、滋阴助阳的补益类药或方剂,对红细胞免疫功能都有促进作用。黄芪多糖在体外能直接作用于红细胞,提高其CR1活性,增强红细胞携带免疫复合物的能力,促进癌症病人红细胞免疫粘附肿瘤细胞,使C3b受体花环率、自然肿瘤红细胞花环率和肿瘤红细胞花环率均有所提高<sup>[6]</sup>。复方丹参能使红细胞膜上的C3b受体活性增强,可以粘附血液中的CIC,防止其在组织中沉积致病;同时还可以促进红细胞膜上的SOD活力增强,有效地促进红细胞免疫粘附功能<sup>[7]</sup>。冬虫夏草口服液可增强肿瘤患者红细胞膜上C3b受体的活性。此受体能粘附、清除免疫复合物与肿瘤细胞。作用机制可能是虫草多糖与红细胞膜上相应的多糖受体结合后,激活C3b受体,从而发挥免疫粘附与清除作用<sup>[8]</sup>。

**2.1.3 中药对单核-巨噬细胞的促进作用** 单核-巨噬细胞系统除具有抗感染作用外,还担负着吞噬突变细胞、肿瘤细胞,分泌IL-1、干扰素、补体等免疫分子,提呈抗原诱发特异性免疫应答,并参与免疫调节等多种免疫作用。许多研究表明白头翁、人参、党参、玄参、黄芪、银耳、金银花、巴戟天、鸡血藤、女贞子、柴胡、熟地、小茴香、防风、三颗针等均对单核-巨噬细胞系统有促进作用。姚月梅等<sup>[9]</sup>研究不同浓度的人参果汁对小鼠免疫功能的影响,结果发现其具有明显增加外

周血吞噬细胞数量和增强吞噬细胞吞噬功能的作用,且高剂量人参果汁可提高小鼠体液免疫功能。戴玲等<sup>[10]</sup>在体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞中加入不同浓度白头翁糖蛋白后,结果发现白头翁糖蛋白能在体外显著增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红的作用,对巨噬细胞分泌IL-1亦有一定的提高作用。

**2.2 中药对免疫器官的促进作用** 动物免疫器官是动物执行免疫功能的组织机构,也是动物机体产生免疫反应的主要场所。动物免疫器官的重量与动物的免疫功能密切相关。法氏囊、脾脏、胸腺等免疫器官的重量可用来评价雏鸡的免疫状况。程朝相等<sup>[11]</sup>证明中药免疫增强剂(由人参、黄芪、党参等组成)可使雏鸡的胸腺、法氏囊和脾脏等免疫器官的重量明显增加,各免疫器官不同区域的T淋巴细胞和浆细胞数也明显增多。其作用机制可能与神经系统、垂体肾上腺皮质系统的功能有关。人参皂甙对小鼠、大鼠及豚鼠等多种动物单核-巨噬细胞系统吞噬功能均有明显的激活作用。黄芪既能促进淋巴细胞的转化,又能增强单核巨噬细胞系统的功能,使E-玫瑰花环形成细胞数增加,并能诱生干扰素,延长某些原代细胞培养和二倍体细胞存活的能力。谷新利等<sup>[12]</sup>研究了从中药方剂(黄芪、茯苓、熟地、补骨脂、何首乌等11种药)中提取的复合多糖对雏鸡免疫功能的影响,结果发现中药复合多糖能促进正常雏鸡腔上囊、脾、胸腺的发育,并使环磷酰胺造成的免疫抑制雏鸡腔上囊、脾、胸腺指数增大。黄军等<sup>[13]</sup>研究中药“增免散”(由黄芪、何首乌、羊红膻、贯众、常山、青蒿、神曲等组成)促进雏鸡免疫器官的生长发育,如胸腺、法氏囊和脾脏的绝对质量和器官指数极显著提高,并能促进肉鸡的生长发育,提高饲料转化率。另外一些单味药如何首乌、冬虫草、黄芪、猪茯苓等也对免疫器官有一定的促进作用。

**2.3 中药对细胞因子的促进作用** 细胞因子是由一些免疫细胞或非免疫细胞合成分泌的小分子蛋白类物质。它们能够调节细胞生理功能,参与多种生物学效应。近年来研究发现,许多中药可促进细胞因子产生,调节机体的免疫功能,维持机体的生理平衡。如中药多糖中的黄芪多糖、香菇多糖、虫草多糖、枸杞多糖等,以及一些传统的补益良方如四君子汤、补中益气汤、四物汤、当归补血汤、六

味地黄汤、金匱肾气丸等。

研究表明, 中药多糖可促进 IL-1、IL-2、IL-6、TNF 等细胞因子的产生与分泌。倪峰<sup>[14]</sup>介绍了黄芪多糖促进 IL-2 产生的能力最显著, 推测 IL-2 含量增加是黄芪扶正的重要机理之一。枸杞多糖在 ConA 协同刺激下可显著增加老龄和成年小鼠脾细胞 IL-2 分泌量, 低浓度时还可促进 IL-3 的分泌。香菇多糖体内外均可增加腹腔 M $\phi$  中产生 IL-1, 且能提高免疫细胞对 IL-2 的敏感性。严林<sup>[15]</sup>研究表明虫草多糖(CDP)对小鼠脾 T 淋巴细胞分泌 IL-2 具有促进作用, CDP 能显著提高人扁桃体活化 T 细胞 TNF- $\beta$  的分泌。章梅等<sup>[16]</sup>研究证明, 四君子汤可通过健脾补气增加脾的胃气和卫气功能从而调节免疫功能。脾虚患者各种细胞因子分泌紊乱, 功能失常, 表现为细胞免疫和体液免疫功能的低下。应用四君子汤治疗后, 其血浆 IL-2、IL-4、IL-5 和 TNF- $\alpha$  水平升高, IgE 分泌增多, CD2-mRNA, IL-4mRNA, IL-5mRNA 呈高表达。证明四君子汤可调整机体内细胞因子的水平高低及功能状态。

**2.4 中药的抗肿瘤免疫作用** 机体的免疫状态与肿瘤的发生、发展密切相关。中医药治疗肿瘤主要通过活化巨噬细胞, 增强网状内皮系统, 促进细胞因子分泌, 还通过抑制肿瘤微血管形成、诱导肿瘤细胞分化、逆转癌细胞多药耐药性、调节细胞信号传导等方面产生抗肿瘤作用。

研究证明, 许多中药如黄芪、人参、枸杞、猪苓、天花粉及扶正复方可提高患瘤机体的免疫功能, 保护化疗、放疗对免疫器官的损伤作用。李宗铎等<sup>[17]</sup>研究发现, 艾克清(人参、黄芪、白术、白茯苓)主要是影响人的肺腺癌细胞和食管癌细胞的增殖周期及促进细胞凋亡, 从而达到抑瘤作用。艾克清组成成分中的人参内含的人参总多糖和皂苷经实验证明能全面增强机体的免疫功能; 黄芪多糖体内实验可以抑制肿瘤生成; 白术性温, 健脾和胃, 燥湿安胎, 可降低癌细胞的增值率、减低瘤组织的侵袭性, 提高机体抗肿瘤反映能力及对肿瘤细胞的细胞毒作用; 白茯苓, 利水渗湿, 健脾补中, 宁心安神, 它的抗肿瘤作用显著; 莪术, 行气破血, 消积止痛, 具有抑杀癌细胞和增强机体免疫力的双重功效。艾克清的中药成分复杂, 药理作用广泛, 抗癌作用具有多靶点、多效应的特点。研究发

现<sup>[18]</sup>, 人参皂苷能抑制肿瘤细胞 DNA 合成及细胞增殖周期。主要作用于有丝分裂前期, 抑制蛋白质和 ATP 的合成, 提高 NK 细胞数量, 促进 IL-2 的分泌, 从而抑制肿瘤细胞的浸润和转移, 促进肿瘤细胞凋亡。体内实验还证实人参总皂苷和黄芪多糖可提高正常小鼠的 NKC 活性, 并可使种植 S180 细胞小鼠的 NKC 活性并使产生 IFN- $\gamma$  和 IL-2 的能力得到增强。

### 3 中药的免疫抑制作用

免疫反应是在抗原刺激下各种免疫细胞成分相互作用的结果。表现为抗体的形成, 或特异免疫活性细胞的产生, 或各种过敏介质的释放。因此清除抗原或抑制抗体, 或抑制免疫活性细胞的产生, 这些均可起到抑制免疫反应的作用。在过敏反应中, 抑制过敏介质的释放, 当然也能达到抑制免疫反应。

研究表明, 单味药如清热解毒药的穿心莲、大青叶、蒲公英、龙胆草、黄柏、大黄; 祛风除湿药的蝉蜕、苍耳、柴胡、麻黄、桂枝、细辛; 毒性攻坚药的雷公藤、砒石、喜树、蝮蛇、蟾酥; 活血化瘀药的丹参、赤芍、川芎、桃仁、红花; 其它如甘草、乌梅、艾叶。复方如二妙散、小青龙汤、石蓝草煎剂等都具有免疫抑制作用。它们产生免疫抑制作用的机制主要通过抑制 T 细胞产生、B 细胞的产生、抑制肿瘤细胞 DNA 合成等。

雷公藤为卫矛科植物雷公藤的根茎, 性凉, 味苦, 具有清热活血的功效。倪艺榕等<sup>[19]</sup>研究发现雷公藤内酯醇能显著抑制巨噬细胞的杀伤活性, 且对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞 IL-2R 表达有明显抑制作用。雷公藤总苷能抑制抗原呈递细胞和抗体分泌细胞的抗绵羊细胞的特异性抗体产生, 抑制兔 E 玫瑰花结形成淋巴细胞转化和豚鼠旧结核菌素迟发超敏反应, 并可明显抑制类风湿关节炎患者外周血单核细胞在体外产生总 IgM-IgM-RF。雷公藤乙酸乙酯提取物及总生物碱对小鼠体液及细胞免疫均有不同程度的抑制作用。其根皮中的单体去甲泽拉木醛在混合淋巴细胞培养中可以抑制淋巴细胞的转化, 而且抑制作用比雷公藤多苷还强。在一定剂量范围内, 其免疫抑制作用随剂量加大而增强。

当归为伞形科多年生草本植物当归的根, 味甘、辛, 性温, 具有补血活血、止痛润肠的功效。杨

铁虹等<sup>[20]</sup>实验研究表明当归多糖对体液免疫有较强的抑制作用。它不仅对正常小鼠血清溶血素、IgG、IgM 的生成有较强的抑制作用,还表现与 CTX 的协同作用,但却能促进小鼠非特异性免疫功能。这可能是由于当归多糖对不同淋巴细胞亚群的作用不同,或是由总糖中不同组分的不同作用引起。

甘草提取物甘草多糖在体内实验中发现能抑制抗体生成,并使 T 细胞分泌 IL-2 减少;而甘草次酸对机体非特异性免疫如 M $\phi$  的吞噬功能具有增强作用。当机体处于虚弱状态时更明显,并能促进干扰素的产生<sup>[21]</sup>。

#### 4 中药作为免疫调节剂的展望

**4.1 饲料添加剂** 自抗生素、化学合成药和类固醇激素作饲料添加剂给人类健康带来危害以后,中药饲料添加剂获得普遍关注。中药作添加剂的优点有:①中药防治畜禽疾病主要是根据中医学扶正祛邪的原则,采用保健开胃,补气活血,增强机体免疫功能,促进新陈代谢,以防治疾病。②保健促生长作用,如在饲料中添加松针、泡桐叶、党参、黄芪、白术等粉料。③中药作添加剂不仅效果好,而且中药本身的天然性、低残留性、不易产生耐药性和毒副作用少等优点,使其在临床应用上具有独特的优势,同时为新型添加剂的开发和应用提供了良好的契机。

**4.2 免疫佐剂** 免疫佐剂是一类能增强机体免疫应答或改变免疫应答类型的物质。近年来研究表明多糖作为免疫佐剂增加免疫力作用显著,如黄芪多糖、枸杞多糖、银耳多糖、灵芝多糖、牛膝多糖等。由于中药资源丰富、毒副作用小、品种繁多,因此,研究和开发新的中药免疫佐剂具有广阔的前景,值得进一步研究。

**4.3 疾病控制** 自身免疫性疾病的形成是一个非常复杂的过程。它是免疫系统对自身组织失去耐受性,即免疫系统对自身成分发生免疫应答而造成的一类疾病。目前治疗自身免疫性疾病常用药是免疫抑制剂。临床常用的免疫抑制药物如激素、环磷酰胺、环孢菌素等,疗效虽已被证实,但只能改善症状,不能有效地从根本上控制疾病的发生和发展,且毒副作用大,不能长期持续应用。因此,应用中药作为免疫抑制剂治疗免疫性疾病也越来越受到人们的欢迎。如临床上用雷公藤治疗

类风湿性关节炎、红斑性狼疮和多形性红斑、肾脏疾病、皮肤病等。

**4.4 存在问题** 中药的药理作用是广泛而复合的。但正是由于中药的化学成分极为复杂,其质量优劣评价方法和相应的质控标准长期以来一直是个难题,也是影响中药现代化的一个主要因素。因此,必需加强中药作用机理的研究,加强中草药成品和原料的质量控制,加强产品的毒理安全研究以及免疫增强剂应用技术探索,以期更加广泛、深入地将中药应用于畜牧兽医生产实践中。

#### 参考文献:

- [1] 席孝贤,贺新怀. 中药相关成分对 T 细胞亚群的调节作用[J]. 陕西中医学院学报, 2002, 25(2): 51-53.
- [2] 欧阳素贞,王双山,田素香,等. 淫羊藿-蜂胶合剂促进鸡细胞免疫的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(1): 80-83.
- [3] 胡宇莉,廖晓兵,黎建华,等. 穿心莲对肉鸡体液免疫的影响[J]. 中国兽药杂志, 2004, 40(9): 24-27.
- [4] 吴小丽,蔡云清,赵岩,等. 蒲公英提取物对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2005, 25(3): 163-165.
- [5] 储岳峰,颜新敏,胡元亮,等. 几种中药成分的免疫增强活性及其作用效果[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(1): 67-70.
- [6] 郭峰,钱宝华,张乐之. 现代红细胞免疫学[M]. 第一版. 上海: 第二军医大学出版社. 2002. 212.
- [7] 闫玉仙,叶路,孙建波. 复方丹参滴丸对小鼠红细胞免疫粘附功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1995, (11): 311-312.
- [8] 秦思昌,孙云汉,龚国川. 虫草对机体免疫系统的影响[J]. 海军医学杂志, 2004, 25(3): 254-257.
- [9] 姚月梅,张英艳,陈国静. 人参果汁对小鼠免疫菌能的影响[J]. 中医学报, 2002, 30(4): 142.
- [10] 戴玲,王华,陈彦. 白头翁糖蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞免疫的增强作用[J]. 中国生化药物杂志, 2000, 21(5): 230-231.
- [11] 程朝相,张春杰,李银聚,等. 中药免疫增强剂对肉仔鸡免疫器官生长发育及免疫活性细胞影响的研究[J]. 中兽医杂志, 2002, (3): 6-8.
- [12] 谷新利,李宏全,王俊东. 从中方剂中提取的复合多糖对雏鸡免疫功能的影响[J]. 中国家业科学, 2005, 38(4): 813-820.
- [13] 黄军,朱红旗,吕建存,等. 中药“增免散”对肉鸡免疫器官及生长发育的影响[J]. 中国兽医杂志, 2006, 40(10): 23-26.
- [14] 倪峰. 免疫活性的中药多糖[J]. 福建中医学院学报, 2001, 11(1): 5.
- [15] 严林. 冬虫夏草的药理研究进展[J]. 青海医学院学报, 2000, 21(4): 37-38.
- [16] 章梅,夏天,张仲海,等. 四君子汤对脾虚患者血浆细胞因子的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001, 21(4): 411-413.

- [17] 李宗铎, 董玉秀, 赵君枚, 等. 连钱草、人参、黄芪等组分的艾克清在小鼠体内抗肿瘤作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(43):145-147.
- [18] Smolinski A T, Pestka J J. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb(1) (ginseng) and parthenolide (feverfew) [J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41(10):1381-1390.
- [19] 倪艺榕, 袁嘉丽, 贺敏. 雷公藤提取物在免疫抑制中的作用[J]. 实用药物与临床, 2005, 8(5):45-47.
- [20] 杨铁虹, 卢保华, 贾敏. 当归多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(4):448-451.
- [21] 王梅娟. 中药双向调节免疫功能的探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 13(5):7-8.

## 发改委农业部联合发文 养猪最高补助 100 万

中央财政再次对规模化饲养生猪伸出援助之手。近日, 国家发改委和农业部联合发文, 生猪扩繁场、种鸡场最高可获得中央财政补助 100 万元。

### 生猪补贴分四个档次

事实上, 我国的通胀压力从去年开始不断增加, 而首当其冲的则是猪肉价格的大幅度上涨。中央财政为此连续出台政策鼓励生猪的饲养, 以及对生猪饲养的补贴。根据国家发改委和农业部的公告, 生猪扩繁场和种鸡场根据规模大小, 每个可获得中央补助投资 100 万元。

生猪标准化规模养殖场根据规模的大小, 可分为四个档次分别进行补助。补助金额从 20 万到 100 万元不等。

事实上, 去年以来生猪价格一直处于上涨的状态, 中间或多或少的有些小的波动, 但是整体趋势处于上涨。

据悉, 生猪价格上涨是基于供应的减少和饲料价格的上涨, 从而带动我国通胀压力的不断增加。我国 CPI 的构成八大类中, 食品占据了三成多。而猪肉的价格大幅度上涨, 就直接导致了通胀压力的增加。

中央财政此次再次大手笔出手, 对生猪规模化饲养和种鸡规模化饲养提供大笔资金, 对生猪市场的供应紧张局面将产生缓和的作用。

“对价格也会起到平抑的作用, 至少不会再出现大幅度上涨的局面” 经济学教授赵晓指出。

自 2007 年开始, 财政部连续出台十项政策扶持生猪养殖, 包括能繁母猪补贴、能繁母猪保险、疫病防疫补助、生猪良种补贴、高致病性猪蓝耳病强制扑杀补偿、屠宰环节病害猪无害化处理补助、生猪调出大县奖励、完善生猪生产消费监测预警体系、增加猪肉储备规模、支持标准化规模养殖场基础设施建设等。

对生猪的饲养可谓费尽心思。上海大龙畜禽养殖有限公司董事长汤卫平对记者表示, 该企业一直从事生猪饲养, 年产 50 万头的规模。对于中央财政的补贴, 企业这几年一直在享受, 并且, 随着政策的变化, 补贴数额逐步增加。

而富腾安康公司董事长程女士告诉记者, 企业已经上缴补贴申请书。获得这些补贴对生猪的成本将有所下降, 对市场猪肉价格将起到平抑作用。

### 奶牛项目最高补贴 150 万

根据发改委公布的各类项目的中央投资补助标准: 每个奶牛标准化规模养殖小区(场), 按年存栏 200-499 头、500-999 头、1000 头以上三个档次分别补助投资 50 万元、100 万元、150 万元。对此, 《每日经济新闻》采访了新希望、光明、蒙牛、伊利等四大乳制品企业, 纷纷为政府的这一举措叫好。“我们去年 12 月份就接到了国务院的中央补贴文件, 部分经费 2 月份已经下发, 一头奶牛大约补贴 500 元左右。”新希望双峰乳业有限公司市场部副总监夏震宇告诉记者, 发改委此次发布的投资补助政策估计企业要段时间才能收到正式文件通知, 乳企们肯定都不会错过这一难得的申报机会。

夏指出, 补助不在于多少, 而在于充分说明国家对乳企的关心和重视, 从而大大增强了乳企对今后经营的信心。这多多少少可以减少乳制品价格上涨的频率和幅度。

他认为, 政府的这一利好政策, 将有利于乳业产业结构的进一步优化, 通过大企业兼并小企业, 淘汰一些不适应市场发展规律的经营不善的企业。

此外, 光明、蒙牛、伊利昨天也纷纷表示, 虽然还没看到相关的通知, 但是可以肯定的是, 政府对奶源的这种高度重视, 对企业发展很有好处。(信息来源: <http://www.gd.agri.gov.cn/>)

# 生物标志物的研究进展

吴晓薇<sup>1</sup>, 黄国城<sup>2</sup>

(1. 广东出入境检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2. 广州市华南农大生物药品有限公司, 广东 广州 511300)

**摘要:** 生物标志物在环境评价中的应用日显重要, 本文是在回顾文献的基础上, 旨在提出侧重于这些方面的全面评述, 包括: 生物标志物及相关术语的基本概念; 暴露生物标志物, 反应或毒性效应生物标志物和易感性生物标志物的性质和实例; 生物标志物对污染物的特异性和生物标志物有害效应的关系; 生物标志物在环境评价中的作用和发展趋向。

**关键词:** 生物标志物; 生物指示物; 环境评价; 生物监测

**中图分类号:** S852.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0014-05

随着分子生物学理论和技术的迅速发展, 生物标志物(biomaker)的研究作为一个崭新的领域逐渐引起了国内外预防医学界的共同关注<sup>[1,2]</sup>。生物标志物被称为是环境医学发展到分子水平的重要里程碑, 它的研究在分子流行病学、分子毒理学、环境医学等诸多领域中均具有极其重要的价值。

## 1 生物标志物及有关术语的基本概述

生物标志物是生物体受到严重损害之前, 在分子、细胞、个体或种群水平上因受环境污染物影响而产生异常变化的信号指标。一种标志物应能敏感有效地反映出生物体发生严重损伤之前的生物变化, 并能准确评估生物体所处的污染状态及其潜在危害, 为严重毒性伤害提供早期警报。近二十年来, 由于生物标志物对评价环境中有毒化学物质暴露的生态风险和健康风险的重要作用, 促使人们对生物标志物的不断深入研究<sup>[3]</sup>。1987年美国国家科学院首先将生物标志物定义为由生物体或样品可测出由外来化合物导致的细胞学或生物化学组份或过程、以及结构或功能的变化<sup>[4]</sup>。Benson和Di Giulio(1992)认为生物标志物是在生物个体所测得的生物化学、生理学或病理学反应, 而这些生物学反应能给出环境污染物的暴露, 或由暴露所引起的亚致死效应资料<sup>[5]</sup>。生物标志物是机体对某种或某些化学物质的生物学反应, 可用以衡量化学物质暴露, 有时也用以衡量毒性效应<sup>[3]</sup>。简言之, 生物标志物是生态毒理学试验的终点, 所谓终点, 即在生态毒理试验过程中所测得生物体的生物学反应。

生物学反应的范围很广, 从分子水平上化学物质与受体的结合直至生态系统的结构和功能改变。然而, 一般认为生物标志物仅限于化学物质与受体的结合至生物个体水平的生物学效应。国内学者曾提出从生物大分子直至生态系统都有各自相对应的污染效应及相适用的生物标志物<sup>[6]</sup>。然而, 种群与群落结构和生态系统功能变化可由众多物理、化学和生物学因素引起, 作为生物标志物的看法并不为众多学者所接受。

生物指示物(Bioindicators)是自上世纪70年代污染生态学中出现并沿用至今的术语。最初是将耐污的生物物种称为指示生物(Indicator species或Bioindicator), 随着污染生态学的野外研究和实验室毒性试验研究, 逐渐将生物指示物的应用范围扩大至污染生态学的不同生物学组织层次, 小至分子水平, 大至生态系统结构与功能, 包括发生在分子、生物化学、生理、病理组织、生物个体、种群、群落和生态系统等不同生物学组织水平上的生物学效应。国际生物科学联盟(I-UBS)生物指示物跨学科委员会举办的历届生物监测国际学术讨论会表明, 生物监测囊括了所有不同生物学组织水平的生物指示物, 除了上述不同生物学组织水平的生物标志物外, 还包括种群、群落和生态系统结构与功能的生物学效应。

生物监测(Biomonitoring)和生物标志物是现代环境评价的两大要素。两者都是将生物学反应应用于环境评价, 但是常被混淆。生物监测是环境监测的一个分支, 将生物学反应应用于监测过

程。生物监测可采用多种形式,从生物体组织内的化学物质残留直至许多可以量化的生物学终点的测定,包括各种分子、生物化学、生物学、形态学和行为的变化,以及诸如生物群落和生态系统中存在的不同物种的丰度和生物多样性等的传统生态学度量变化的各种生物标志物或生物指示物。

## 2 生物标志物的分类和各种类型的生物标志物

一般可将生物标志物分为三类,即暴露生物标志物(Biomarkers of exposure),反应或毒性效应生物标志物(Biomarkers of responder or toxic effect),易感性生物标志物(Biomarkers of susceptibility)。这三类生物标志物有时会有部分重叠,有的生物标志物较简单,而有的却很复杂。理想的生物标志物必须可定量、敏感、特异和易于测定,而且须与真实剂量的生物化学机制和毒作用有关。有些生物标志物既可用于体外(In vitro)研究,亦可用于体内(In vivo)研究。有些生物标志物特别应用于哺乳动物或其他物种,而其他的生物标志物则可应用于各种生物。

**2.1 暴露生物标志物** 暴露生物标志物仅指示机体经化学品的暴露,但并不能提供由此引起有害效应程度的资料。暴露生物标志物一般依靠测定体液和组织中特定化学物质或者其代谢物,或者与生物分子相互作用形成的产物。暴露生物标志物可分为体内剂量标志物(markers of internal dose)和有效剂量标志物。前者指示生物机体暴露的发生和程度,后者指示靶分子、结构和细胞受暴露程度。

**2.1.1 体内剂量生物标志物** 尽管生物暴露于化学物质可以通过外环境监测结果来估算,但毒物吸收、分布和排泄有生物个体的变异性。因此,通过测定体液或组织中特定化学物质或其代谢物的浓度,即可知道机体已遭特定化学物质暴露的程度。在测定特定化学实际暴露时,尤其以测定其代谢物为好。由于谷胱甘肽(GSH)对生物所暴露的活性物质的解毒作用,谷胱甘肽共轭作用所形成的代谢物作为潜在暴露标志物曾引起学者广泛重视<sup>[7]</sup>。特定代谢物的测定,如GSH共轭的最终产物、各种巯基尿酸是较好的体内剂量生物标志物。

**2.1.2 有效剂量生物标志物** 有效剂量生物标

志物可表示特定化学物质暴露导致该化学物质或其代谢物已到达毒效应靶位。由于化学物质的代谢率和途径可能存在个体之间差异,测定靶位点的有效剂量较测定体内剂量好。有效剂量通常是通过测定组织或体液中特定的加合物(Adducts)来确定。活性化学物质或经代谢形成与DNA反应的活性中间体化学物质,因其遗传毒性和可能的致癌作用尤其为人们所关注。蛋白质和DNA加合物可用于暴露于活性烷基化作用物质的生物标志物。在受苯乙烯暴露的机体曾检出DNA加合物、苯乙烯化氧-0-6-鸟嘌呤<sup>[8]</sup>。N-7-胍基-黄曲霉素B加合物(N-7-guanyl aflatoxin B1 adduct)可作为受黄曲霉素B1(Aflatoxin B1)暴露的生物标志物<sup>[9]</sup>。

DNA数量可能有限,但对于蛋白质如血红蛋白形成加合物来说通常并不是问题。血红蛋白加合物的另一个优点在于可指示慢性暴露,已见有以实验动物探索研究血红蛋白加合物作为除草剂暴露生物标志物的报道<sup>[10]</sup>。

大多数DNA,血红蛋白和白蛋白加合物是选择性的有效剂量生物标志物。也有指示反应已经发生,但并没有该加合物结构资料的非选择性生物标志物,如32P标志后的检测DNA加合物,这一广为采用的非选择性生物标志物<sup>[11]</sup>,能从每109-1010个碱基中检出1个加合物,但并不能给出其结构资料。这一检测技术已广泛应用于哺乳动物(包括人类)和其他类动物如鱼类的研究。

尽管许多无遗传毒性的有毒化合物亦能产生活性代谢物,但还未见有对这些化学物质有效剂量生物标志物的研究报道,这说明即使这些化合物有靶分子存在,现在还并不清楚。

**2.2 反应或毒性效应生物标志物** 确定化学物质的生物学效应的生物标志物很多,从最简单的标志物如监测体重变化至复杂的标志物如采用免疫化学技术测定特定同功酶。在机体对化学物质暴露的生物学反应中,较为有用的病理变化标志物是适用于连续暴露的生物标志物,如血液中许多酶标志物。这种技术的先进性和实用性可由同功酶(例如乳酸脱氢酶、肌酸激酶)活性分离而得以进一步提高,能更精确指示受损害的器官,组织或者细胞器。酶抑制是重要的反应/效应生物标

志物。有的反应可从血液测出,例如,有机磷化合物引起乙酰胆碱酯酶抑制,铅引起氨基乙酰丙酸脱水酶(Aminodaevulinic acid dehydrase)抑制。酶活性抑制持久,因此,可作为重要的效应生物标志物。血细胞数和血细胞损伤的检测可提供各种资料,例如,出现姊妹染色单体交换指示染色体潜在损伤,可由环氧乙烯暴露引起;缺乏特有淋巴细胞指示免疫抑制,可由二恶英(TCDD)等化学物质引起。特殊抗体如抗核抗体的出现是对化学物质暴露(例如胂苯吡嗪)的一种生物学反应,尽管这类抗体还没有被广泛用作生物标志物,但它们在敏感性和特异性方面有着很好的发展前景。

细胞色素 P450 同功酶的诱导是一种适应性反应,可用作多种生物暴露于不同化合物,如有机氯化物和多环芳烃化合物的效应生物标志物。在血清或组织所测定的一些生物化学效应是对有毒化学物质暴露的适应性和保护性反应,例如,对金属如镉的暴露的反应过程中会增加金属硫蛋白的形成。应激蛋白是潜在的毒性效应标志物,应激蛋白合成增加是机体对环境胁迫因素的反应过程中,由于基因表达改变而引起的,此反应相当快(可在几分钟或几小时内发生)。应激蛋白 hsp72 是较好的生物标志物之一,因为通常在生物体内存在量很小,所以一旦增加就会十分明显。人们发现应激蛋白不仅存在于哺乳动物和其他动物,也存在于植物和微生物,因而使应激蛋白有可能成为广泛应用的生物标志物。研究表明,应激蛋白 hsp72 浓度的增加可由镉暴露引起,但另一种毒物(如胂)暴露并不引起应激蛋白浓度增大<sup>[12]</sup>。

**2.3 易感性生物标志物** 近几年来,由于遗传变异在毒性反应中的作用显得日益重要,易感性变异及其标志物受到极大关注。外来化合物进入机体后经历四个阶段中变异性的最重要来源是代谢,它已成为研究最多的领域。许多酶显示出遗传的多态性(Dolymorphisms),可能与癌症等疾病有关。但是,在生态毒理学中的易感性生物标志物研究报道尚不多见。

### 3 生物标志物的特异性及与有害效应的关系

**3.1 生物标志物对污染物的特异性** 各种生物标志物的特异性差异很大,由铅引起的氨基乙酰

丙酸脱水酶(ALAD)的抑制具有高度的特异性,但许多不同污染物也能引起的免疫系统产生非特异性生物标志物。现有生物标志物对污染物的特异性递减顺序为:ALAD 抑制、金属硫蛋白、卵壳变薄、AChE 抑制、抗凝血凝固蛋白、单加氧酶诱导、卟啉形态、维生素 A 酶形态、DNA 和血红蛋白加合物、其它血清酶、应激蛋白、免疫反应。

高度特异性和非特异性的生物标志物在危害性(hazard)评价中都具有重要意义。当从水禽采集血液样品并测定 ALAD 活性时,无需进一步测定铅浓度就能确定处于铅中毒风险的水禽百分率。但是 ALAD 活性测定并不会给出可能存在其他污染物的任何资料。

乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制对有机磷和氨基甲酸酯杀虫剂具有特异性。大脑中乙酰胆碱酯酶活性抑制,可作为在法律上被认可的由这些杀虫剂引起动物死亡的证据。这种酶活性的测定要比测定农药残留量更容易、可靠,因为其中不少杀虫剂在体内降解很快,通常难以用化学方法测定这些农药的残留。然而,为了验证这些杀虫剂中的哪一种化学物质引起动物死亡,杀虫剂的化学分析是必要的。因此,乙酰胆碱酯酶的抑制对农田或者受到农田径流影响地区的农药污染调查研究是有价值的生物标志物。

许多化学物质都能引起单加氧酶的诱导,尽管其诱导并不会给出其特有原因的资料,但它仍是能指示生物已受污染影响的有用生物标志物。

**3.2 生物标志物与有害效应的关系** 生物标志物对污染物的特异性与有害效应特异性并不一致。如按有害效应的特异性顺序排列,就会发现与上述排列顺序不同。有害效应特异性递减顺序为:卵壳变薄、AChE 抑制、ALAD 抑制、抗凝血凝固蛋白、血浆维生素 A 和甲状腺素抑制、单加氧酶诱导、DNA 完整性、免疫反应、DNA 和血红蛋白加合物、其它血清酶、卟啉形态、金属硫蛋白、应激蛋白。突出的例子是列为首位的卵壳变薄,人们发现许多物种的卵壳变薄 16%~18%以上是与种群衰退有关。

生物标志物反应与有害效应之间并无明显关系,这并不说明生物标志物的应用没有意义。首先,生物标志物证明了生物机体已暴露于一种或



几种污染物并足以引起一种生理变化。有的生物标志物是一种保护机制,如金属硫蛋白的诱导。对被诱导的可能保护机制程度的了解,在评价生物个体风险时是有价值的。其次,它对于是否应作进一步研究也有指示作用,例如,虽然在许多情况下,损伤已经修复或者没有发生有害效应,但几乎没有人会轻视化学物质对DNA完整性的损伤。因此,尽管有些生物标志物与有害效应并无关系,但它们仍可作为指示暴露的生物标志物。

#### 4 生物标志物在医学中的应用<sup>[13,14]</sup>

**4.1 研究外源性化合物毒性作用机制** 研究外源性化合物在机体内代谢降解过程;活性中间物、终产物在机体内的分布、分布模型、生物半衰期等,不仅可以阐明化学损伤作用机制,而且还为生物标志物的应用奠定了理论基础。

**4.2 确定毒物在机体内的存在及其所产生的损害的性质和程度** 与环境监测相比,接触生物标志物更能准确地反映机体及靶组织的实际接触剂量,而且某些标志物综合了多途径进入的毒物和一段时间内接触毒物的总和,具有更良好的剂量-反应关系,其中生物有效剂量标志物反应了毒物或其代谢产物直接与细胞内靶分子相互作用的性质和程度,更直接地代表了毒物对机体的损害的性质和程度。

**4.3 研究毒代动力学** 确定生物接触限值(Biological Exposure Limit 对生物材料中生物标志物所规定的最高容许量,叫作生物接触限值,也常称作生物阈限值。通过正确选择生物标志物,研究其毒代动力学,建立动力学数学模型,再结合现有的TWA值、MAC值,就可外推出生物阈限值。

#### 5 选择生物标志物的原则<sup>[15]</sup>

**5.1** 所选择的生物标志物必须具有一定的特异性。

**5.2** 所选择的生物标志物必须具有足够的灵敏度,即所选标志物的水平与外接触水平要有剂量-反应关系,在无害效应接触水平下仍能维持这种关系。

**5.3** 所选择的生物标志物分析的重复性及个体差异都在可接受的范围内。

**5.4** 所选择的生物标志物要有足够的稳定性,便于样品的运送、保存、分析。

**5.5** 取样时最好对人体无损害,能为受试者所接受。

## 6 生物标志物研究的发展趋势

**6.1 生物标志物研究的规范化** 我国的生物监测工作始于50年代初,但由于仪器设备及科学知识的局限,监测指标主要是体液中的毒物及其代谢产物,监测方法主要是化学法或者薄层层析法。随后又开展了一些生化指标(如血中胆碱酯酶、 $\delta$ -ALA、血卟啉、高铁血红蛋白等)和细胞遗传学指标(如微核、染色体畸变、姐妹染色单体交换等)的研究。90年代初期,世界卫生组织把生物标志物的概念规范化,才引发了该领域研究的质的飞跃。

**6.2 新技术新方法迅速应用** 新的现代化的仪器分析技术如:GC-MS(气相色谱-质谱仪)、MNR, HPLC-MS 高压液相色谱-质谱仪),PCR(聚合酶链反应)技术、单细胞凝胶电泳技术、荧光原位杂交技术等的应用,极大地促进了生物标志物的研究的迅速发展。

**6.3 计算机模拟技术大显身手** 计算机可以模拟外源性化合物在体内的代谢过程,并拟合出相应的数学模型,为预测生物标志物在体内的动态变化提供线索,已在生物标志物的研究领域大显身手。

**6.4 多学科多实验室共同攻关** 生物标志物的研究涉及到生物化学、分子生物学、病理学、肿瘤学、药理学、毒理学、环境医学、分析化学、有机化学、临床医学和流行病学等领域,在各个专业的科学家共同关注下,已取得了长足的进步。

**6.5 寻找更多灵敏、特异的生物监测指标** 随着生物标志物研究的迅速发展,人们已能够得心应手地从各个层次寻找生物监测指标。故生物标志物已达到多元化的水平。

**6.6 监测方法的标准化及质量控制** 为保证生物监测结果的可靠性,国际上许多国家对监测方法逐步实施标准化,对生物样品的取样、保存、测定、结果的统计处理及质量控制等都做出详细规定。

#### 参考文献:

- [1] WHO, IPCS Environmental Health Criteria. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles[C]. Geneva, World Health Organization. 1993.
- [2] Rappaport S M, Symanski E, Yager J W, et al. The relationship between environmental monitoring and bioaogical

markers in exposure assessment[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(Suppl):49-53.

[3] Walker C H, Hopkin S P, Sibly R M, et al. Principles of Ecotoxicology[M]. London: Taylor & Francis Ltd, 1996.

[4] National Research Council. Committee on Biological Markers[J]. Environmental Health Perspective, 1987, (74):3-9.

[5] Benson W H, Di Giulio R T. Biomarkers in Hazard Assessments of Contaminated Sediments I A J. BURTON G A. Sediment Toxicity Assessment[C]. Chelsea USA: Lewis Publishers, 1992. 241-265.

[6] Wang H L, Tao S. Application of Biomarkers in Aquatic Environmental Research[J]. China Environmental Science, 1999, 19(5):421-426.

[7] De Rooij B M. Mercapturic Acids in Biological Monitoring-application to Industrial Chemicals[D]. Amsterdam, The Netherlands: Vrije Universiteit. 1996.

[8] Hemminki K, Vodicka P. Styrene: from Characterization of DNA Adducts to Application in Styrene-exposed Lamination Workers[J]. Toxicol Lett, 1995, (77):153.

[9] Groopman J D, Wogan G N, Roebuck B D, et al. Molecular Biomarkers for Aflatoxins and Their Application to Human Cancer Prevention[J]. Cancer Res, 1994, (54):1907.

[10] McClure G Y H, Freeman J P, Lay J O, et al. Haemoglobin Adducts as Biomarkers of Exposure to the Herbicides Propanil and Fluometuron[J]. Biomarkers, 1996, (1):136.

[11] Van Welie R T H, van Dhck R G J M, Vermeulen N P E, et al. Mercapturic Acids, Protein Adducts and DNA Adducts as Biomarkers Of Electrophilic Chemicals. Crit[J]. Rev Toxicol, 1992, 22(5/6):271.

[12] Dilworth C, Timbrell J A. An Investigation into the Sensitivity of Heat Shock Proteins as Markers of Cellular Damage: a Comparative Study of Hydrazine and Cadmium Chloride in Primary Rat Hepatocyte Cultures[J]. Biomarkers, 1998, (3):177.

[13] 周炯亮. 生物标志物在生化毒理学中的应用[M]. 卫生毒理学, 1994, 8(4):231-234.

[14] 吕素芳, 李金有, 译. 常元勋, 校. 生物标志物在劳动卫生学研究和实际应用中的进展[J]. 国外医学卫生学分册, 1994, 21(5):265-268.

[15] 王敢峰, 叶能权. 职业接触的生物监测及展望[J]. 职业医学, 1992, 19(6):359-361.

欢迎订阅

ISSN1005-8567  
CN 44-1243/S

# 《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

主管单位: 广东省农业科学院

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

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

订 价: 每期定价 5.5 元, 全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

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

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

# 仔猪缺铁性贫血的成因及综合预防措施

周汉柱

(广东省高州农业学校, 广东 高州 525200)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0019-02

仔猪缺铁性贫血是初生仔猪的常见疾病。该疾病无论在规模化养猪场或在个体养猪专业户都时有发生。轻症影响仔猪的生长发育,重症易形成僵猪甚至出现仔猪死亡现象。故该病应引起养猪界的高度重视,我们应了解其发病因素并采取有效措施进行预防。

## 1 仔猪缺铁性贫血的成因

**1.1 猪舍结构及环境因素** 目前,猪场的猪舍地面大多数以水泥或石板结构为主,加上环境条件限制,仔猪的活动场地不足,使仔猪难以接触土壤获得外源性铁的补充。

**1.2 饲养管理因素** 养猪场的饲养管理水平低,其中主要表现在:(1)母猪妊娠期或哺乳期,饲料中营养不全面,缺乏铁、铜、钴等微量元素或饲料配合不合理,饲喂含钙质过多的贝壳粉、骨粉、碳酸钙或含鞣酸过多的高粱等饲料,这些饲料中的钙质、鞣酸与铁在肠道相遇后易形成难以溶解吸收的化合物,影响了铁的吸收,从而降低了母乳中铁的水平;(2)诱导仔猪开食过迟。一些猪场在仔猪出生2周后才开始诱导开食,这大大延缓了仔猪消化系统器官的生长发育及消化吸收机能的提高,即使通过口服补铁,吸收量亦有限。

**1.3 仔猪自身因素** 仔猪初生时,体内铁的储存量极其有限,而其迅速的生长发育所需铁量高达7~15 mg/天,加上仔猪自身各系统器官发育不完善,调节吸收机能较差,而初生仔猪铁的来源仅通过母乳,但母乳中铁日含量约为1 mg左右,远远满足不了仔猪生长发育的需求,因此导致了仔猪缺铁性贫血的发生。

**1.4 补铁措施不恰当** 目前,大多数猪场预防仔猪缺铁性贫血多以注射或口服铁制剂为主,但由于认识不足或者应用不合理,在补铁时,铁制剂常

与含较多的铝、镁、钙等制剂或四环素、氯霉素等药物混合或同时使用,大大降低了铁制剂的效果或影响了仔猪对铁的吸收。

由于以上因素的影响,引起了仔猪快速生长发育对铁的高需求与母乳铁、外源性铁供给不足之间的矛盾,导致了仔猪缺铁性贫血的发生。仔猪出现了精神沉郁、食欲减退,被毛粗乱无光、形体消瘦、离群伏卧不愿意活动,可视粘膜苍白甚至黄染;出现呼吸、脉搏增数,体温较低,四肢末梢厥冷,站立时两腿肌肉震颤等症状。针刺仔猪耳静脉出血少,血液色泽淡而稀薄,不易凝固。若早发现早治疗,大多数发病仔猪预后良好。否则,引起仔猪生长发育受阻和抵抗力下降,加上仔猪自身调节机能较差,极易受到不良的环境条件和饲养管理等因素影响而诱发仔猪腹泻、肺炎等疾病,导致出现僵猪甚至仔猪死亡的现象,严重降低了养猪的经济效益,因而需要采取有效措施预防该病的发生。

## 2 仔猪缺铁性贫血的综合预防措施

**2.1 加强饲养管理** 给妊娠母猪和哺乳母猪饲喂营养全面且富含铁、铜、钴等微量元素的全价饲料;注意饲料搭配的合理性,适当减少钙质饲料及含鞣酸过多饲料的饲喂,以增强母猪对铁的吸收,提高母乳中铁的含量。

**2.2 注射铁制剂** 仔猪1-3日龄时,肌肉注射牲血素、富来血等铁制剂1 mL或含铁量100~150 mg的制剂,重症的仔猪隔周后以同样剂量再注射一次。同时给仔猪喂服0.01%的硫酸铜溶液,以促进仔猪对铁的吸收。

### 2.3 口服铁铜合剂

**2.3.1 硫酸亚铁** 200 g、硫酸铜 40 g,加水 10 kg 混匀后供仔猪自由饮用或将以上剂量的硫酸亚

铁、硫酸铜研成粉末与红土混匀后撒入仔猪舍内，供仔猪自由啃食。

2.3.2 涂抹法：硫酸亚铁 450 g、硫酸铜 75 g、水 200 mL，加适量葡萄糖、淀粉混匀后拌成铁淀粉糊剂，涂抹在母猪乳头及其周围供仔猪吮吸。

2.4 撒放泥土 条件许可，在猪舍地面或运动场内撒放一些干净的深层砂壤土或红壤土让仔猪自由采食。

2.5 诱导仔猪早开食 应尽早诱导 5-7 日龄仔猪自由采食全价乳猪料，以锻炼仔猪消化系统器官发育及消化吸收机能的提高，增加仔猪对铁的吸收。

2.6 合理运用铁制剂，提高仔猪对铁的吸收率 在使用铁制剂时，避免与含铝、镁、钙等制剂及与四环素、氯霉素等药物合用，以影响仔猪对铁的吸收或者降低铁制剂的效果。

综上所述，要防止或者最大限度减少仔猪缺铁性贫血的发生，养殖生产者必须高度重视，加强饲养管理及改善环境条件，在供给仔猪足量铁的同时，注意提高仔猪对铁的吸收率，从而有效缓解仔猪对铁需求与供给之间的矛盾，满足仔猪快速生长发育对铁的高需求，以减少仔猪缺铁性贫血的发生，避免不必要的经济损失，提高养猪经济效益。

(上接第 8 页)

疫苗。经过三次免疫，只产生针对 ORF7 编码的 N 蛋白的特异性抗体。

#### 4 展望

PRRSV 免疫应答产生的复杂性和病毒逃避机体免疫系统为疫苗的研制和疾病的根除带来了很大困难。一种优秀的疫苗包括有效、通用、安全和能够区分疫苗毒与自然感染。这就需要 PRRSV 结构和功能进行深入研究，逐步了解 PRRSV 的致病机理，为研制优秀的疫苗提供理论依据。

#### 参考文献：

[1] Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of Virology*[J]. 2004, 149(7):1341-1351.

[2] Chen J, Liu T, Zhu C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence[J]. *Biochemical Genetics*, 2006, 44(9-10):425-435.

[3] Li Y F, Wang X L, Bo K T, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China[J]. *Veterinary Journal*, 2007, 174(4):577-584.

[4] Neumann E J, Kliebenstein J B, Johnson C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, 227(3):385-392.

[5] Zhang Linghua, Tian Xingshan, Zhou Fengzhen. Vaccination with porcine reproductive and respiratory syn-

drome killed virus vaccine and immunostimulatory oligodeoxynucleotides induces specific immunity in piglets[J]. *Vaccine*, 2007, 25(10):1735-1742.

[6] Nielsen H S, Oleksiewicz M B, Forsberg R, et al. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(6):1263-1272.

[7] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 93(1):25-38.

[8] Kritas S K, Morrison R B. Effect of orally administered *Lactobacillus casei* on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccination in pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 119(2-4):248-255.

[9] Wang Y, Liang Y J, Han J, et al. Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence[J]. *Virology*, 2007.

[10] 郑其升, 毕志香, 陈溥言, 等. 共表达猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒 NJ-a 株 ORF4、ORF5 与 ORF6 基因重组改良型痘病毒安卡拉株的构建[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2):345-349.

[11] Verheije M H, Kroese M V. Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs[J]. *Vaccine*, 2003, 21(19-20):2556-2563.

[12] 江云波, 肖少波, 方六荣, 等. 共表达猪繁殖与呼吸综合征病毒修饰型 GP5 和 M 蛋白增 DNA 疫苗免疫应答的研究[J]. *病毒学报*, 2007, 23(2):130-136.

[13] Barfoed A M, Blixenkrone-Møller M, Jensen M H, et al. DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus[J]. *Vaccine*, 2004, 22(27-28):3628-3641.

# 营养物质对仔猪免疫力的影响

田树海

(河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001)

**摘要:** 本文针对仔猪在断奶后出现各种应激现象, 从营养素(糖类、脂类、蛋白质、矿物质元素、维生素)角度来调节仔猪的免疫力, 增强机体对疾病的抵抗力, 进而减少药物的使用, 为生产绿色、有机的畜产品奠定基础。

**关键词:** 仔猪; 免疫力; 营养调控

**中图分类号:** S852.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0021-04

随着规模化养殖水平不断提高, 仔猪早期断奶越来越普遍。它不仅能提高母猪的生产力和圈舍设备的利用率, 而且可以减少疾病的母源传播, 还可以提高仔猪的生长性能以及后期的生长效果。然而, 仔猪断奶后常常出现食欲降低、消化不良、饲料利用率低、免疫力和抗病力下降及腹泻等现象, 最终表现为生长抑制。大量研究表明, 营养素可以在胃肠道、胸腺、脾脏、淋巴结和循环免疫细胞等各水平上进行免疫功能调节。近年来, 有关营养素与免疫功能之间相互关系的研究取得显著进展, 本文主要阐述各种营养素对仔猪免疫力的影响。

## 1 蛋白质、氨基酸对仔猪免疫功能的影响

蛋白质对仔猪的免疫功能有重要的影响。若蛋白质长期缺乏, 机体营养不良将引起胸腺组织发生严重萎缩病变, 同时, 子宫内胎儿胸腺的发育也受到影响; 外周器官——脾脏和淋巴结的大小、重量、组织结构, 细胞密度和细胞分布都有明显变化。Li 等<sup>[1]</sup>报道, 早期断奶仔猪采食大豆蛋白质后血液中含有高水平的抗大豆抗体 IgG。Gu<sup>[2]</sup>研究表明, 饲料蛋白质水平显著影响断奶仔猪肠绒毛高度和肠上皮淋巴细胞含量。饲料蛋白质水平从 63 g/kg 增加到 249 g/kg 时, 断奶仔猪肠绒毛高度和肠上皮淋巴细胞含量显著增加。侯永清等<sup>[3]</sup>报道了不同水平日粮蛋白质与赖氨酸对机体免疫机能的影响: 蛋白质与赖氨酸主要影响机体的细胞免疫机能。不同赖氨酸水平对血清 JRG 效价无

显著影响, 而注射植物凝集素 (PHA) 的皮褶厚度有显著差异。此外, 在皮褶厚度变化的影响上, 日粮蛋白质水平与赖氨酸水平之间的交互作用极显著 ( $P < 0.01$ )。这说明, 日粮蛋白质水平和赖氨酸水平对体液免疫无影响, 但影响机体的细胞免疫反应, 而且, 这种影响与蛋白质水平与赖氨酸水平的适宜组合有关。计成等在 25 日龄断奶仔猪日粮中添加 3 个水平的 Thr (0.60%, 0.68%, 0.76%), 2 个 Lys 水平 (0.29%, 0.39%), 测定不同 Thr 水平对免疫器官重量、淋巴细胞数量及组成、血液 Ig 效价、及 SR-BC (绵羊红细胞) 免疫后抗体效价。结果表明, 日粮 Thr 和 Met 的不同水平显著影响血液中 IgG 效价及抗 SRBC 抗体效价 ( $P < 0.05$ ), 机体免疫机能最佳时适宜的 CP、Lys、Met 及 Thr 水平分别为 18%、1.3%、0.39% 及 0.68%。

## 2 脂质对仔猪免疫功能的影响

脂肪酸的缺乏会使淋巴组织萎缩, 降低了对 T 细胞依赖性抗原 (TD) 与 T 细胞非依赖性抗原 (TI) 的反应。但若给动物饲以高脂日粮, 其受病原菌的感染率与死亡率明显升高。过量多不饱和脂肪酸 (PUFA) 可使胸腺萎缩, 损害淋巴细胞与粒细胞的功能, 抑制淋巴细胞转化、迟发皮肤超敏反应和抗体形成细胞反应, 降低机体对结核杆菌、大肠杆菌的抵抗力。国内外研究表明, 共轭亚油酸 (CLA) 可以提高猪的生产性能及免疫力。Bas-saganya 等<sup>[4]</sup>在猪日粮中添加 CLA, 结果表明可提高猪的日增重、降低饲料采食量、提高饲料利用

率。同时,日粮中添加 CLA 可以影响猪体液免疫与细胞免疫,从而增强免疫力、减少疾病的发生率。王菊花等<sup>[5]</sup>研究日粮中添加 CLA 对断奶仔猪生产性能与免疫的影响。结果表明,当日粮中 CLA 的添加量为 1.0%和 2.0%时,可以显著提高断奶仔猪试验末重、日增重、饲料利用率、IgM 水平、T 淋巴细胞转化率、CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 及 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 比例,降低仔猪采食量及腹泻率,而对 IgG、IgA 水平及 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 无显著影响。Hontecillas 等<sup>[6]</sup>认为 CLA 有改善断奶仔猪生长性能和增强免疫功能的作用。添加 1.33%CLA 可以降低早期断奶仔猪因肠炎引起的肠道黏膜损伤,使细胞因子(干扰素- $\gamma$  和白介素 IL-10 等)和淋巴细胞亚群(CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 等)水平达到健康猪只的水平。

### 3 维生素对仔猪免疫功能的影响

**3.1 维生素 A** 维生素 A 可调节免疫应答反应,提高机体抗感染和抗肿瘤能力。研究发现,V<sub>A</sub> 可增强 TI 抗原所导致的抗体产生数量,并可作为免疫佐剂增强卵蛋白诱导的 IgG 与 IgE 反应。表明 VA 能直接作用于 B 细胞而增强机体的抗体反应。林映才等<sup>[7]</sup>在基础饲料上添加 2 200 IU/kg 维生素 A 可使体重为 4~9 kg 的早期断奶仔猪获得较好生长性能;添加 11 000 IU/kg 维生素 A 时,仔猪免疫功能较高。

**3.2 维生素 E** 维生素 E 是一种有效的免疫调节剂,能够增强淋巴细胞对丝裂原刺激的反应性和抗原-抗体反应,促进吞噬。当 V<sub>E</sub> 缺乏时,细胞 RNA 和蛋白质合成及机体免疫功能明显受抑,TH 细胞数量大幅减少,降低热应激作用。高秦燕等<sup>[8]</sup>研究表明,应激后 T4 随 V<sub>E</sub> 增加而增加的趋势,而血糖浓度随 V<sub>E</sub> 的增加而减少。应激前后血液中 IgG 含量之差有随 V<sub>E</sub> 添加而减少的趋势,表明 V<sub>E</sub> 可降低猪对应激敏感性和提高猪的免疫力。王胜利等<sup>[9]</sup>探讨不同抗热应激剂在高温条件下对猪血清生化指标和免疫功能的影响,结果表明,V<sub>C</sub>、V<sub>E</sub>、大豆黄素和牛磺酸能降低热应激时猪体内皮质醇水平和提高猪免疫力。

**3.3 维生素 C** 维生素 C 是维持动物体正常免疫功能所必需的营养素。V<sub>C</sub> 能增强正常嗜中性白细胞的活性,改善免疫功能异常者嗜中性白细胞

的游走、杀菌能力,使细胞内异常升高的 cAMP 恢复正常。还可以增加补体 C<sub>1</sub> 的产生,促进干扰素合成,增强巨噬细胞吞噬杀菌功能,提高血清中 IgA、IgG、IgM 和补体 C<sub>3</sub> 浓度。赵君梅等<sup>[10]</sup>研究发现,在日粮中添加维生素 C 可显著仔猪增加全血血红蛋白、红细胞压积和红细胞数;经植物凝集素(PHA)诱导的皮褶厚度增加;但不影响淋巴细胞、单核细胞和嗜中性细胞数,V<sub>C</sub> 还有提高血清碱性磷酸酶,改善肠道铁吸收能力的趋势;维生素 C 对仔猪生产性能没有影响。

### 4 矿物质元素对仔猪免疫功能的影响

**4.1 铜** 铜在调节仔猪免疫功能方面起着重要的作用。它对细胞免疫、体液免疫、抗感染及抗肿瘤等都有着不同程度的影响。缺铜时仔猪的免疫功能受损,具体可以表现为胸腺萎缩、免疫细胞活性降低、对丝裂原刺激应答反应降低、抗体合成受损和抗体效价降低。大多数学者认为铜主要通过抗氧化酶系发挥作用。正常情况下,体内产生的超氧离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)等强氧化剂被抗氧化酶系(SOD 等)及时清除。铜以酶的形式参与 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 清除并且通过抗氧化来保护生物膜结构和功能的完整性来实现免疫调节功能。赵昕红等<sup>[11]</sup>研究表明,高铜饲养组猪的嗜中性白细胞、单核细胞比率增加,增强了仔猪清除自由基的能力,提高了仔猪的抗应激能力。李大刚等<sup>[12]</sup>通过对断奶仔猪进行为期 30 d 的高铜试验(250 mg/kg)显示,高剂量铜可以提高仔猪的免疫力,使仔猪腹泻率降低 27.02%,而日增重提高 30%。

**4.2 锌** 锌可提高机体的免疫反应,刺激仔猪生长。高锌可使血浆中免疫球蛋白浓度显著升高,从而使仔猪的免疫能力增强,生长速度加快,腹泻率降低。Duchateau<sup>[13]</sup>研究发现补锌可提高免疫球蛋白含量。耿爱莲等<sup>[14]</sup>也认为血清免疫球蛋白的含量随日粮锌水平提高而显著增加,腹泻率显著降低。冷静等<sup>[15]</sup>研究发现日粮中添加适量高锌(1 000 mg/kg 和 3 000 mg/kg)能显著增加免疫球蛋白含量,而添加 5000 mg/kg 日粮锌组会对 Ig 含量的上升产生抑制作用。王敏奇等<sup>[16]</sup>发现,饲料中添加 3 000 mg/kg 氧化锌,仔猪肝脏组织中 Cu-Zn-SOD 活性上升 48.52%(P<0.01),显著提高了肝脏组织中

MT的含量,为对照组(100 mg/kg)的13倍。高锌组仔猪血液中的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)都升高,因此推测:高锌能提高保护机体免受自由基损伤的潜力。

**4.3 铬** 铬作为一种必需微量元素对动物的免疫功能具有重要影响。铬可提高疫苗的免疫效果或通过降低皮质醇浓度或通过其他由免疫细胞设防的中间产物来提高动物的免疫机能。Lee Derna等<sup>[17]</sup>研究表明,4周龄断奶仔猪日粮添加甲基吡啶铬(铬为400 μg/kg)可以提高仔猪的免疫机能、伪狂犬病毒抗体效价、PHA刺激后淋巴细胞转化率以及血液中IgG和IgM含量。与之相反,Heugten<sup>[18]</sup>报道,21日龄断奶仔猪日粮添加铬200 μg/kg,不能减弱大肠杆菌脂多糖(LPS)刺激引起的仔猪生长抑制,但可以提高未接受免疫应激仔猪的ADG和ADF。

**4.4 铁** 铁可激活多种酶。血浆中铁以铁传递蛋白和铁蛋白的形式被大量转运到组织,并有血浆铜蓝蛋白(铁氧化酶I)回收组织的铁到血液以供再分配。铁的缺乏,核糖核酸酶活性降低,肝、脾和胸腺蛋白合成减少,IL-1、IL-2及干扰素分泌也减少,免疫细胞分化成熟及整个免疫应答过程受损;巨噬细胞和NK细胞功能下降,并降低分裂原或抗原的增殖反应。刘惠芳等<sup>[19]</sup>研究表明,母、仔猪均补饲氨基酸螯合铁,可显著提高哺乳仔猪断奶窝重和断奶成活率,极显著提高了血清免疫球蛋白IgG水平,显著提高仔猪抗病能力,并明显表现有协同增强免疫力的作用。郭海涛等<sup>[20]</sup>报道在断奶仔猪基础饲料中已添加FeSO<sub>4</sub>形式铁元素100 mg/kg基础上,再以复合氨基酸铁形式添加铁元素75 mg/kg,能显著提高仔猪日增重、降低料重比、腹泻率和仔猪血清免疫球蛋白IgG水平。

**4.5 其他矿物质元素** 钙、磷、硒等元素也可以直接参与免疫应答过程,缺乏任何一种都会使免疫功能下降。钙离子作为一种重要的信使物质,可调节淋巴细胞分裂,介导巨噬细胞吞噬功能。Kegley等<sup>[21]</sup>报道随饲料磷水平增加,断奶仔猪SRBC抗体和卵清蛋白抗体水平都呈线性下降;提高饲料磷水平,能增强细胞免疫功能,但降低体

液免疫功能。Ferencik<sup>[22]</sup>研究硒具有明显的抗肿瘤作用和免疫增强作用。补充硒可增强初次和再次免疫反应,提高动物体Ig抗体滴度,还可影响细胞毒素和T淋巴细胞活性。

## 5 多糖对仔猪免疫功能的影响

黄芪多糖是黄芪的主要活性成分之一,具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抗辐射和抗应激等作用,在临床上常用于治疗肝炎、肿瘤等疾病。黄芪多糖对动物免疫器官的影响主要体现在对动物胸腺、脾脏和法氏囊重量的影响。梁华平<sup>[23]</sup>研究表明,黄芪多糖能显著增加小鼠脾脏、胸腺重量,提高其脾脏指数及胸腺指数,对肠系膜淋巴结重量也有一定的增加作用。黄芪多糖还能提高机体对抗原的免疫应答能力,增强巨噬细胞的吞噬能力;对于各种药物及不同的应激模式下的免疫功能降低,均具有明显的免疫增强作用。魏凤仙等<sup>[24]</sup>报道在饲料中添加黄芪多糖能提高生长猪血液中球/白比值,提高机体体液免疫和细胞免疫的能力,也即具有提高动物机体免疫性能的能力。边传周等<sup>[25]</sup>在仔猪断奶应激模式下添加黄芪多糖,添加组与对照组相比淋巴细胞百分数减少,中性粒细胞百分数增多,淋巴细胞转化率及抗SR-BC特异性抗体水平升高。这说明APS的添加可明显提高仔猪的细胞、体液免疫功能。

板蓝根多糖可促进小鼠胸腺的发育和胸腺细胞的增殖,间接地维持胸腺微环境,促进T淋巴细胞、胸腺上皮细胞分泌胸腺素和细胞因子,提高机体的免疫力。张红英等<sup>[26]</sup>报道,板蓝根多糖能显著提高仔猪的CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>淋巴细胞的百分数和特异性抗体滴度。刘惠等<sup>[27]</sup>研究中草药复合多糖能显著提高断奶仔猪日增重,降低料重比,并能提高断奶仔猪免疫器官指数。复合多糖对断奶仔猪生长性能和免疫器官指数的提高均优于单一多糖和抗生素,且在饲料中添加0.6%和0.9%的中草药复合多糖效果较好。王彬等<sup>[28]</sup>利用寡糖替代抗生素来研究对泌乳母猪免疫力的影响,结果表明,半乳甘露寡糖可以显著降低泌乳期母猪血清中的甘油三酯水平,而吉它霉素和维吉尼亚霉素虽也有降低的趋势,但未达显著水平。半乳甘露寡糖还可以显著提高泌乳期母猪血清中的免疫球蛋白M水平,

吉它霉素和维吉尼亚霉素也有提高的趋势, 不过也未达显著水平。综合看来, 半乳甘露寡糖可以通过改变母猪的血清生化指标而间接地起到提高免疫能力和健康水平的作用, 其总体改善效果要明显好于吉它霉素。

## 6 结论

动物免疫系统的机能状态决定动物抵御传染病和环境应激的能力。对动物机体而言, 营养素是一个最重要和最容易调控的因素。因此, 根据动物免疫系统的发育规律, 建立满足动物最佳免疫水平条件下各营养素的最适添加量, 从而提高动物的抗病力和抗应激能力。

## 参考文献:

- [1] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria[J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69(8): 3299-3307.
- [2] Gu X, Li D. Effect of dietary crude protein level on villous morphology, immune status and histochemistry parameters of digestive tract in weaning piglets [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2004, 114(14): 113-126.
- [3] 侯永清, 闫于明, 等. 日粮蛋白质、赖氨酸、蛋氨酸及苏氨酸水平对早期断奶仔猪免疫机能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2002, (4): 18-20.
- [4] Bassaganya R J, Hontecillas M R, Bregandabl K, et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid in nursery pigs of dirty and clean environments on growth, empty body composition, and immune competence[J]. *Journal of Animal Science*, 2001, (79): 714-721.
- [5] 王菊花, 薛秀恒, 刘光林, 等. 共轭亚油酸对断奶仔猪生产性能及免疫的影响[J]. *中国饲料*, 2006, (2): 22-27.
- [6] Hontecillas R, Wannemuehler M J, Zimmerman D R, et al. Nutrition regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid[J]. *Journal of Nutrition*, 2002, 132(7): 2019-2027.
- [7] 林映才, 蒋宗勇, 刘炎和, 等. 维生素 A 对早期断奶仔猪生长性能和免疫功能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2003, 39(6): 14-16.
- [8] 高秦燕, 元小红, 郭传甲.  $V_E$  对生长育肥猪的应激、免疫及肉品质的影响[J]. *山西农业大学学报*, 2003, (2): 139-142.
- [9] 王胜林, 林映才, 郑黎, 等. 抗热应激剂对肥育猪血清生化指标的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2003, 39(1): 11-12.
- [10] 赵君梅, 李德发, 朴香淑, 等. 维生素 C 对早期断奶仔猪免疫机能的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2001, 37(6): 15-17.
- [11] 赵昕红, 李德发. 高铜和高锌对仔猪生长性能、免疫功能和抗氧化酶活性的影响[J]. *中国农业大学学报*, 1999, 4(1): 91-96.
- [12] 李大纲, 雷风. 高铜对早期断奶仔猪腹泻的影响试验[J]. *河南畜牧兽医杂志*, 2001, 22(4): 6.
- [13] Duchateau J. Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects[J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 34: 88-93.
- [14] 耿爱莲, 岳鹏飞. 不同锌水平饲料对育成蛋鸡体内代谢及免疫功能的影响[J]. *中国饲料*, 1997, (16): 7-9.
- [15] 冷静, 戴志明, 杨国明, 等. 日粮锌水平对断奶仔猪生产性能免疫器官及组织锌的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(2): 211-214.
- [16] 王敏奇, 许梓荣. 氧化锌、蛋白锌对仔猪胴体组成的影响及机理探讨[J]. *浙江农业学报*, 2001, 13(4): 205-209.
- [17] Lee Dernan, Yen HougTa, Shen Tian Fu h, et al. The effects of chromium picolinate supplementation on growth performance and immunity response of weanling pigs[J]. *J of the Chinese Society of Animal Science*, 1997, 26(4): 373-386.
- [18] Heugten E Van, J W Spears. Immunity response and growth of stressed weanling pigs fed diets supplemented with organic or inorganic forms of chromium[J]. *J Anim Sci*, 1997, (75): 409-416.
- [19] 刘惠芳, 周安国, 王之盛, 等. 氨基酸螯合铁对哺乳仔猪生产性能的影响[J]. *中国饲料*, 2003, (23): 16-20.
- [20] 郭海涛, 王之盛, 周安国. 复合氨基酸铁对断奶仔猪生产性能的影响[J]. *养猪*, 2005, (3): 6-8.
- [21] Kegley E B, Spears J W, Auman S K. Dietary phosphorus and an inflammatory challenge affect performance and immune function of weanling pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(2): 413-419.
- [22] Ferencik M, Ebringer L. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system[J]. *Folia Microbi*, 2003, 4(83): 4174-26.
- [23] 梁华平, 王正国. 黄芪多糖及人参茎叶皂甙对创伤小鼠免疫器官影响[J]. *中医研究*, 1996, 9(2): 15-17.
- [24] 魏凤仙, 李绍钰, 孔祥书, 等. 黄芪多糖对生长猪生产性能及免疫性能的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(10): 17-19.
- [25] 边传周, 王老七. 黄芪多糖对断奶仔猪免疫功能及腹泻的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2005, 31(1): 10-12.
- [26] 张红英, 赵现敏, 崔保安, 等. 板蓝根多糖对猪繁殖与呼吸综合征疫苗免疫猪 T 细胞亚群的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, (23): 134-137.
- [27] 刘惠, 李丽立, 张彬, 等. 中草药多糖对断奶仔猪生长性能和免疫器官指数的影响[J]. *养猪*, 2007, (1): 5-6.
- [28] 王彬, 黄瑞林, 印遇龙. 寡糖取代抗生素对泌乳母猪血清生化指标的影响[J]. *饲料广角*, 2006, (9): 24-26.



# 一起雏鹅大肠杆菌病的诊治报告

董军成

(江苏省滨海县正红镇多种经营服务中心, 江苏 滨海 224521)

中图分类号: S858.33

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0025-02

大肠杆菌病是由某些血清型的致病性大肠埃希氏杆菌所引起的传染病的总称,是目前危害养禽业健康发展的重要细菌性传染病之一。家禽中大肠杆菌的感染较常见,不同品种不同日龄的鸡、鸭、鹅等均有易感性。因不同血清型的致病性大肠杆菌对药物的敏感不同,往往治疗效果不好,所以给养禽业造成一定经济损失。2007年5月9日,江苏省滨海县正红镇某养殖户饲养的23日龄雏鹅发生一种以拉稀、呼吸困难以及眼炎为主要临床症状的疾病,全群800羽,死亡率为10.5%。作者对送检的病雏鹅进行剖检,经实验室诊断,确诊为大肠杆菌病。现报告如下:

## 1 发病情况

2007年4月中旬,江苏省滨海县正红镇某养殖户购入雏鹅800只进行饲养。主诉:饲养到23日龄时发现鹅群异常,精神不振,食欲下降,部分病鹅排白色稀粪,张口呼吸,不愿走动。曾用青霉素治疗,病情未见好转,于是该养殖户用水禽用基因工程干扰素注射治疗,并在日粮中添加电解多维、禽用微量元素,磷酸氢钙饲喂,仍不能控制病情,病鹅接着出现结膜发炎、流泪、眼睑水肿等症状,有的临死前出现仰头、扭头等神经症状。购入前鹅群已注射过小鹅瘟疫苗,至5月9日来求诊时共死亡80多只。

## 2 剖检病变

送检的8只雏鹅的主要剖检病理变化为:肝脏肿大(8/8),肝周炎(8/8),心包炎(3/8),气囊炎(8/8),气管黏液(8/8),十二指肠出血(5/8),脾脏稍肿(4/8)。

## 3 实验室诊断

3.1 细菌的分离培养 按无菌操作要求,用接种

环分别从肝脏和气囊中采样(分别标记为A株和B株),分别划线接种到血平板和麦康凯琼脂平板上,置37℃培养24h,在血液琼脂平板上长出边缘整齐、隆起的较大灰白色菌落,溶血。在麦康凯琼脂平板上,形成中等大小的玫瑰红色菌落。

3.2 细菌形态的观察 分别挑取从肝脏和气囊分离到的单个菌落,涂片,革兰氏染色,油镜下观察到红色、两端钝圆、散在或成对存在的短杆菌。

3.3 药敏试验 按常规纸片法进行药敏试验,结果发现:对氟苯尼考、恩诺沙星高敏;对氧氟沙星、丁胺卡那霉素中敏;对青霉素、庆大霉素低敏。

## 4 治疗

4.1 环境消毒 鹅粪堆积发酵,用百毒杀(浓度为1:600)对场地、环境、用具进行消毒,1次/天,连用5d。

4.2 药物治疗 ①用氟苯尼考按0.05%配成水溶液饮用,连用5d。②用高效大肠杆菌净(药物主要成份为:黄连、黄芩、板蓝根、穿心莲、黄柏)按1g/kg日粮拌料饲喂,连用5d。③提高机体抗病力:饮水中添加电解多维、维生素C(按0.1%配成)连用5d。治疗3d后,病情明显好转,6d后电话回访,全群恢复正常。

## 5 小结与讨论

5.1 从分离到的细菌的菌落形态结果来看,A、B两株细菌的结果几乎完全一致,说明我们从肝脏和气囊分离到的细菌为同一种细菌。通过麦康凯琼脂鉴别培养基培养、涂片染色镜检结果,结合病鹅的临床表现及特征性病理变化,初步确定分离的两株细菌同为大肠杆菌。

5.2 该养殖户在雏鹅发病后用了青霉素进行治疗,未见有所好转;对分离的细菌进行药物敏感性

试验的结果显示,该病例中青霉素对细菌的抑制作用的敏感性较差,因此建议使用氟苯尼考或恩诺沙星进行治疗。因为致病性大肠杆菌容易产生耐药性,往往治疗效果不好,所以建议养殖户治疗大肠杆菌病时,最好先对细菌进行分离和药物敏感性试验,根据药物敏感性试验的结果来选用高敏的药物交替使用,以提高疗效。

5.3 大肠杆菌病一年四季均可发生,密度过大、通风不畅、氨气含量高、湿度大、卫生条件差等均可促进该病的发生,且易复发。因此,应以预防为主:使用不同致病菌株混合制备油乳剂灭苗苗预防;同时,还要搞好环境卫生,清除粪便、勤换垫草、保持通风,加强消毒等综合性防制措施。

农业部卫生部举行部际联席会议 研究共同加强疫病防控和食品质量安全工作

3月31日,农业部部长孙政才与卫生部部长陈竺以及农业部副部长尹成杰、国家首席兽医师贾幼陵、农业部总经济师张玉香等两部有关负责人和专家在农业部召开部际联席会议。两部有关负责同志通报了近期禽流感、人畜共患病防控和农产品质量安全监管情况,认真分析当前疫情及防控工作形势,并就充分发挥防控合作机制作用,进一步加强合作,进行了深入细致的研究。

两部充分肯定了前一时期双方加强协作,密切配合,联防联控,在禽流感、人畜共患病防控工作和农产品质量安全监管中建立的良好合作机制和取得的明显成效。一是成立了两部防控禽流感及其他重大人畜共患病领导小组和工作小组,完善了协调机制,有效开展防控工作。二是坚持定期例会制度和疫情通报制度,两部专家定期商讨防控工作中存在的问题,及时提出应对政策和措施建议,及时沟通信息。三是建立了联合督导机制,农业部门重点加强动物疫情流行病学调查和监测,卫生部门重点加强疫点疫区内高危人群抽检和医学观察,共同提出应对措施。四是加强实验室技术交流,双方及时相互提供病毒分离株及其基因序列信息、相关病料样品及诊断试剂标准品。五是成立了防控高致病性禽流感专家组,充分利用和发挥两部专家的作用,资源共享。两部在农产品质量安全和食品安全合作方面也取得积极进展,在标准制定、农产品质量安全事件应急处理、国际食品法典等方面,都能充分沟通,通力协作,取得良好效果。

两部对近期全国禽流感及其他人畜共患病疫情形势进行了认真分析。今年前3个月就发生4起禽流感疫情,出现3例人感染病例,全国禽流感疫情形势依然严峻,防控任务十分艰巨。加之周边国家疫情不断,对我构成严重威胁。部分地区仍有可能散发家禽疫情,人间禽流感病例零星发生的可能性依然存在。针对当前防控工作中存在的问题,两部就进一步加强活禽市场监管、深入研究人感染禽流感途径、加强人畜共患病防控工作等方面研究了下一步应对措施。

两部认为,农业部、卫生部要在长期良好合作的基础上,进一步密切联系,促进交流与合作,共同推进禽流感及其他重大人畜共患病防控和农产品质量安全监管工作。双方研究提出了下一步工作重点。在禽流感和人畜共患病防控工作方面,一是加强信息通报。及时通报禽流感及其他重大人畜共患病疫情监测结果,加强信息沟通。充分利用和发挥各自专家资源的作用,定期研究防控对策。二是加强活禽市场监管。为进一步贯彻落实《国务院办公厅关于整顿和规范活禽经营市场秩序加强高致病性禽流感防控工作的意见》(国办发[2006]89号)要求,近期两部将会同工商总局联合下发通知,加大城市活禽市场监管力度,并组成联合检查组对奥运举办城市人口密集区的活禽交易市场,以及部分重点城市的活禽交易市场监管工作进行一次全面检查,防止通过市场环节传播禽流感,降低人感染禽流感的风险。三是加强人感染禽流感途径研究。鉴于目前多起人感染禽流感病例难以查找疫源的实际情况下,两部将组成专家组,深入研究人感染禽流感途径、防范措施,包括流行病学和人-禽跨种传播规律等。四是加强人畜共患病防控。两部要加强与财政部门协调,增加狂犬病、布病等防控投入,促进人畜共患病防控工作。

在农产品质量安全工作方面,一是建立高层次的部门协调机制。通过定期不定期的交流和沟通,推进农产品、食品的监测和执法信息共享,促进技术交流与合作,做到资源互补。二是加强农产品质量安全风险评估合作。两部要积极组织有关专家,尤其是发挥风险评估委员会作用,加强交流,为制定检测标准和质量安全事件应急提供科学依据。三是参照FAO和WHO设立国际食品法典委员会的架构和做法,充分利用农业部协调国际农药残留标准的有利条件,由两部牵头成立全国农药残留标准化技术委员会,秘书处设在农业部农药检定所,促进国内国际农药残留标准的有效衔接。(信息来源: <http://www.china-ah.com/>)

# 灰狼股骨骨折治疗报告

成世清, 王静, 陈武  
(广州动物园, 广东 广州 510070)

中图分类号: S858.299

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0027-02

伴侣动物如犬、猫等发生骨折,临床上经常可见,治疗技术也较为成熟。野生动物骨折也经常发生,但治疗难度较高,需要考虑多方面的因素。2006年,广东某野生动物保护中心有两匹灰狼发生股骨骨折,我们借鉴治疗宠物骨折的内固定技术,结合中医的外固定治疗技术对患病动物进行了治疗,取得了很好的疗效。现报道如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床病例** 成年灰狼2只,均为雌性,年龄不详,体重分别为30 kg与33 kg,患病前与其他狼只合群饲养于一400 m<sup>2</sup>的笼舍,无既往病史。检查发现,灰狼A为左后肢股骨远端发生横骨折,灰狼B为右后肢股骨中部发生斜骨折,其骨折断端均已发生错位,骨折处肿胀严重。

**1.1.2 实验材料** 医用4孔和6孔DCP接骨板、骨螺钉、骨凿、骨钻、钢丝和钢丝钳。

### 1.2 方法

**1.2.1 保定** 动物侧卧保定,分别对患侧臀部、股部剃毛,常规消毒。

**1.2.2 麻醉** 采用846复合麻醉剂0.1 mL/kg,用吹管行臀部肌肉注射。手术时,配合0.5%盐酸普鲁卡因局部浸润麻醉。

**1.2.3 术部** 切口定位于大腿外侧、大转子与股骨外髁连线中段。

### 1.2.4 手术过程

**1.2.4.1 打开手术通道** 沿股骨轮廓、平行于股二头肌前缘切开皮肤及皮下组织,在股肌膜上切一小口,并在股二头肌上扩延,在股外侧肌和股二头肌之间分离。用拉钩将股二头肌向后方牵位,同时将肌外侧肌拉向前方,充分暴露股骨。找到骨折处后,清除凝血,结扎断裂的静脉血管。

**1.2.4.2 骨折内固定** 将患肢骨折近、远端对抗牵引,并整复、压迫两断端使其对合。除去创口内的血凝块及骨碎片,用生理盐水冲洗。置入灭菌的不锈钢接骨板,使骨折线居中,先后在接骨板两端孔内钻孔和旋入固定螺丝,再依次打孔旋入其他螺丝。钻孔前可用手术刀在钻孔处骨膜上切一小口,再用消毒骨钻一直钻穿对侧骨皮质。接着使用细一点的钻头插入孔中,以测量其深度,然后用钢丝钳将骨螺钉截至适当长度,使其拧紧后刚好从对侧孔中露出。考虑到单用螺丝固定仍不够牢固,最后另用钢丝加固。

**1.2.4.3 闭合创口** 再次用生理盐水冲洗创腔,确认无出血、无血凝块后,连续缝合肌肉,包埋接骨板,并确保没有形成死腔,间断缝合皮肤,用碘酊消毒皮肤创缘后装结系绷带。

**1.2.4.4 外固定手术** 考虑到灰狼的野性较大,可能强烈奔跑造成内固定失败,于是对这2匹狼进行了辅助外固定。在骨折处放置一块脱脂棉作衬垫,衬垫四周放置数块杉树皮做成的小夹板,打几圈石膏绷带固定。然后,在患处股部至爪部放置数块烤制成与动物股部形状相仿的竹制大夹板,内衬脱脂棉,其长度超过竹板,以防竹板损伤皮肤。最后包扎螺旋绷带,每缠绕一圈绷带,外涂适量石膏以加强固定效果。为使局部血液循环畅通,绷带不宜过紧,以不使夹板滑脱即可。

**1.2.5 手术用药** 手术期间静脉滴注阿莫西林等抗菌药物。手术完毕注射与846合剂等量的苏醒灵,促使灰狼苏醒。

**1.2.6 术后护理** 术后将患病灰狼隔笼单独饲养,由经验丰富的饲养员护理,保持动物安静,避免剧烈运动,同时适当增加营养,并在其食物中包夹抗菌药投喂,连续5 d。12 d后改为包夹活络丸等药

物投喂,以促进断骨愈合与肌腱发育。手术 30 d 后,拆除外固定材料,观察患肢负重情况,并逐步增加灰狼活动,促使其患肢功能的锻炼与恢复。

## 2 结果

手术后对骨折部位进行 X 光检查发现,灰狼 A 骨折断端对合良好,而灰狼 B 骨折断端的间隙偏大。

术后 30 d 拆除外固定夹板时,创口愈合良好,组织肿胀消失,两只灰狼患肢均可负重行走。X 光检查发现,接骨板位置正常,骨断端接触良好,原骨折线已分辨不清,但灰狼 B 骨折断端稍有错位。术后 45 d,灰狼 A 运动自如,无明显功能异常;灰狼 B 患肢股部肌肉稍萎缩,但运动功能未受影响。

## 3 讨论

3.1 为提高内固定手术的成功率,应最大限度地

保护骨膜。在骨干上钻孔时,先用手术刀在骨膜上做一小切口,可防止钻头撕裂骨膜。

3.2 接骨板的长度应为被固定骨干直径的 4~5 倍,骨螺钉应以刚穿出对侧骨皮质为宜。肌肉缝合时一定要严密,尽量把接骨板包埋于肌肉内,不要留有空腔。

3.3 对灰狼骨折施行内固定后,在患肢外侧装置以杉皮制成的小夹板,起到一定的外固定效果。同时因有弹性,能够防止因固定过紧造成术部缺血坏死。

3.4 考虑到对灰狼的保定与麻醉难度较大,术后未拆除内固定接骨板。经过 1 年的跟踪观察,体内接骨板未影响灰狼的运动。但体内的接骨板是否会影响其骨骼生长,引起骨骼远期的不良变化,还有待于进一步观察。

## 农业部开展兽药市场专项整治行动

农业部 3 月 23 日在湖南长沙启动全国兽药行业“优质兽药出厂、放心兽药入户”行动,这标志着今年兽药市场专项整治行动启动。

这一整治行动是按照 2008 年全国农资打假专项治理行动的有关部署而开展的。

国家首席兽医师贾幼陵指出,近年来,我国兽药行业管理工作取得明显成效,但与保证动物产品供应和质量安全的要求相比,仍面临着更加艰巨的任务,要通过开展整治行动,在全行业形成重质量、保安全、抓监管的良好氛围,构建加强兽药行业管理的长效机制,建立健全重大动物疫病疫苗生产、监管、储备、调拨、招标等管理制度和兽药安全监管机制。

记者了解到,此次兽药专项整治行动的主要任务有:

一、强化重大动物疫病疫苗质量监督,通过强化落实驻厂监督、粘贴专用防伪标签和飞行检查等措施,使重大动物疫病疫苗生产企业驻厂监督率达 100%,飞行检查率达 100%，“二合一”防伪标签粘贴率达到 100%,更好地满足重大动物疫病防控需要。

二、加强兽药残留监控。加大兽药残留监控和治理力度,重点对违禁药品进行残留检测,逐步完善残留超标产品追溯制度。

三、完善兽药产品质量监督抽查工作机制,对常规兽药实施评价性监督抽查,重点加强对重大动物疫病的监督抽检力度,加强对重点品种和重点监控企业的跟踪抽检,加强质量监管,促进兽药产品质量进一步提高,力争兽药质量监督检查总体合格率提高 3 个百分点。

四、加强兽药生产、检验、经营、使用等环节的全过程监管和指导。做好兽药生产企业的督查检查工作,进一步做好兽用生物制品企业的批签发工作,兽用生物制品批签发率达 100%。

启动仪式上,全国 28 家兽药骨干企业现场向湖南省动物疫病防控部门和长沙县养殖户无偿捐献兽药(包括生物制品)35 个品种 6.2 万多瓶(支、袋),消毒剂 9 个品种 1 万多千克(升)。农业部兽医局和中国兽医药品监察所现场发放科普图书、宣传挂图等约 5500 册,动物疫病防控知识影视光碟 1500 多张。(信息来源:新华网)

# 广东省猪瘟流行野毒 E2 基因的扩增及其序列分析

邓雨修<sup>1</sup>, 宋延华<sup>1</sup>, 王东东<sup>2</sup>, 苏润环<sup>1</sup>

(1. 广东温氏食品集团有限公司, 广东 新兴 527400; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:** 运用 RT-PCR 技术对 3 株广东省近期流行的猪瘟野毒的 E2 基因进行了扩增, 并进行核苷酸序列分析, 同时与国内外参考毒株的抗原序列进行了比对分析, 绘制系统发育进化树。结果表明, 3 株流行毒株 E2 基因间核苷酸序列的相似性为 81.9%~90.9%, 所推导氨基酸序列相似性为 56.6%~77.4%; 与石门株之间核苷酸序列的相似性为 82.3%~93%, 所推导氨基酸序列相似性为 57%~84.5%。经系统发育关系分析, 1 株属于基因 1 群 (group1), 2 株属于基因 2 群 (group2), 提示近期猪瘟流行毒株的变异呈现一定的多样性。

**关键词:** 猪瘟病毒; E2 基因; 序列分析

**中图分类号:** S852.65\*1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0029-04

猪瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV) 为黄病毒科瘟病毒属成员。由 CSFV 引起的猪瘟 (CSF) 被列为 A 类传染病, 因而受到世界各国的重视。近年来, 我国猪瘟发生率又呈上升趋势, 其流行病学特点发生了显著的变化, 以非典型猪瘟、温和型猪瘟和母猪流产、死胎、新生仔猪死亡为主<sup>[1]</sup>。因此, 对猪瘟病毒进行分子流行病学分析, 了解猪瘟流行毒株间的差异对于猪瘟的防治十分必要。CSFV 为单股正链 RNA 病毒, 其 RNA 长约 12.3 kb, 含一个大的开放阅读框 (ORF)<sup>[2]</sup>。其中病毒 E2 基因编码其主要抗原结构蛋白, 该基因的序列分析有助于研究 CSFV 的抗原结构与免疫保护间的相关性<sup>[3,4]</sup>。

本试验通过 RT-PCR 与基因测序技术, 分析了近期流行于广东省的 3 株猪瘟野毒 E2 基因的核苷酸序列, 分析猪瘟流行野毒株的变异程度, 为揭示我省猪瘟流行的多样性、变异性及其生态分布规律, 提供必要材料。

## 1 材料与方法

**1.1 毒株** 3 株猪瘟流行野毒病料分别收集于广东省内不同地区猪群, 经兔体交互免疫实验及

免疫组化法鉴定, 分别命名为 ChG 株、G1A 株和 Wu 株; CSFV 疫苗毒株购自辽宁益康生物制品厂。

**1.2 试剂** TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品; RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0、DNA Marker DL2000 和 pMD18-T Vector 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒为上海生物工程公司产品; 常规试剂均为分析纯产品。

**1.3 引物的设计与合成** 根据 GenBank 发表的 CSFV 石门株和 Alfort 株的基因序列, 设计了一对主要针对 CSFV E2 基因的引物 (P1、P2), 包括完整的 E2 基因主要抗原编码区域。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。引物序列、位置及扩增片段大小见表 1。

**1.4 病毒 RNA 的提取** 具体操作参照试剂盒说明书进行, 同时以 ddH<sub>2</sub>O 和 CSFV 疫苗毒为阴阳对照。

**1.5 RT-PCR 及序列测定** RT-PCR 反应参照试剂盒说明书进行, 同时设立阴阳性对照。所得扩增产物经纯化后克隆到 pMD18-T 载体中, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取质粒, 经酶切和 PCR 鉴定为阳性后, 送往宝生物工程 (大连) 有限公司测序。

**1.6 序列分析** 利用 DNA Star 软件和 phylip

表 1 CSFV E2 基因 RT-PCR 扩增引物

引物名称	序列	引物位置	扩增片段长度
P1	5' -ACCAGATTGGTGGCCGTATGAAAC-3'	2229-2253	1304bp
P2	5' -CAGCGCGAGTTGTTCTGTTAGAAC-3'	3557-3533	



		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	█	90.9	82.1	83.0	84.4	83.0	84.4	83.8	95.2	84.5	98.2	83.0	95.7	83.6	94.2	1	ChG
	2	10.0	█	81.9	82.3	83.2	82.2	83.0	83.0	92.1	83.4	91.4	82.2	90.8	83.2	92.0	2	GIA
	3	17.4	17.6	█	93.0	95.5	92.8	95.2	91.0	83.2	94.9	82.3	92.9	82.1	96.0	82.7	3	Wu
	4	20.6	21.1	3.8	█	95.7	99.7	95.3	91.4	84.2	95.3	83.0	99.9	82.6	94.5	83.8	4	Shimen
	5	18.5	19.9	1.1	4.5	█	95.6	99.3	93.5	85.4	98.8	84.4	95.6	84.2	96.8	85.1	5	Alfort
	6	20.4	21.2	4.0	0.3	4.6	█	95.2	91.1	84.2	95.2	83.1	99.8	82.6	94.3	83.8	6	Wuhan
	7	18.5	20.1	1.4	4.9	0.7	5.1	█	93.2	85.4	98.4	84.4	95.2	84.2	96.6	85.1	7	ALD
	8	19.4	20.0	6.0	9.3	6.9	9.6	7.2	█	85.2	92.8	83.9	91.4	83.8	93.0	84.8	8	Brescia
	9	5.0	8.5	15.8	18.5	16.8	18.4	16.8	17.0	█	85.5	95.6	84.2	95.6	84.5	96.2	9	Denmark
	10	18.4	19.8	1.7	4.9	1.2	5.1	1.6	7.7	16.9	█	84.7	95.2	84.5	96.3	85.3	10	GPE
	11	1.8	9.4	17.1	20.1	18.2	20.0	18.2	18.8	4.6	18.1	█	83.1	96.1	83.6	94.5	11	GX
	12	20.4	21.2	3.9	0.1	4.5	0.2	5.0	9.4	18.4	5.0	20.0	█	82.6	94.4	83.8	12	HCLV
	13	4.4	10.1	17.3	20.8	18.5	20.7	18.5	19.0	4.6	18.4	4.0	20.7	█	83.5	94.7	13	HK
	14	19.7	19.9	0.6	5.8	3.2	6.0	3.5	7.5	18.1	3.8	19.3	5.9	19.4	█	84.1	14	Swh
	15	6.2	8.6	16.5	19.0	17.2	18.9	17.1	17.6	3.9	17.3	5.8	18.9	5.5	18.6	█	15	Taiwan

图3 不同 CSFV 毒株 E2 基因相应核苷酸的相似性比较

		Percent Identity																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergence	1	█	77.4	58.7	60.0	63.1	60.4	62.9	60.7	88.1	63.3	95.1	60.0	89.8	60.9	85.0	1	ChG
	2	26.9	█	56.6	57.0	58.3	57.5	58.0	58.5	80.1	58.5	77.9	57.0	77.4	58.0	80.1	2	GIA
	3	59.2	63.9	█	84.5	89.8	84.5	88.8	79.4	60.2	88.6	58.7	84.5	59.0	90.3	60.4	3	Wu
	4	56.7	62.8	17.5	█	89.1	99.5	88.1	79.6	61.7	88.1	60.2	100.0	59.2	87.4	61.9	4	Shimen
	5	50.4	60.2	11.0	11.8	█	89.1	98.5	84.5	64.3	97.6	62.4	89.1	62.6	92.7	64.8	5	Alfort
	6	55.7	61.8	17.5	0.5	11.8	█	88.1	79.1	62.1	88.1	60.7	99.5	59.7	87.4	62.4	6	Wuhan
	7	50.9	60.7	12.1	13.0	1.5	13.0	█	84.2	64.3	96.6	62.4	88.1	62.6	91.7	65.0	7	ALD
	8	55.2	59.7	24.2	23.9	17.5	24.5	17.8	█	63.3	83.3	60.7	79.6	60.9	85.0	63.3	8	Brescia
	9	13.0	23.2	56.2	53.3	48.2	52.3	48.2	50.0	█	64.3	88.8	61.7	89.6	61.9	90.5	9	Demark
	10	50.0	59.7	12.4	13.0	2.5	13.0	3.5	19.0	48.2	█	62.6	88.1	62.9	91.3	64.8	10	GPE
	11	5.0	26.2	59.2	56.2	51.8	55.2	51.8	55.2	12.1	51.4	█	60.2	90.5	60.7	85.9	11	GX
	12	56.7	62.8	17.5	0.0	11.8	0.5	13.0	23.9	53.3	13.0	56.2	█	59.2	87.4	61.9	12	HCLV
	13	11.0	26.9	58.7	58.2	51.4	57.2	51.4	54.7	11.3	50.9	10.1	58.2	█	61.2	86.7	13	HK
	14	54.7	60.7	10.4	13.9	7.7	13.9	8.8	16.8	52.8	9.3	55.2	13.9	54.2	█	61.9	14	Swh
	15	16.8	23.2	55.7	52.8	47.3	51.8	46.8	50.0	10.1	47.3	15.6	52.8	14.7	52.8	█	15	Taiwan

图4 不同 CSFV 毒株 E2 基因所编码氨基酸的相似性比较

核苷酸序列进行分析比较。结果见图2。

**2.3 核苷酸和氨基酸序列分析** 克隆测序后,用 DNA Star 软件和 phylip 软件与 GenBank 中已发表的有代表性的猪瘟毒株相应序列进行相似性分析。3 株流行毒株 E2 基因间核苷酸序列的相似性为 81.9%~90.9%, 所推导氨基酸序列相似性为 56.6%~77.4%; 与石门株之间核苷酸序列的相似性为 82.3%~93%, 所推导氨基酸序列相似性为 57%~84.5%。比较结果见图3、图4。

**2.4 3 株广东省流行毒的系统关系分析** 用 DNA Star 软件将核苷酸相似性分析结果绘制系统发育进化树,并参照国内外猪瘟病毒基因分群的方法,3 株广东省近期流行猪瘟毒株中 Wu 株属于基因1群(group1),与国内标准强毒 Shimen 株、弱毒株 HCLV 株和 Brescia 株属同一基因型;ChG 株和 GIA 株属于基因2群(group2),与 Alfort 株

属同一基因型。这一结果也与相似性分析结果相吻合。结果见图5。

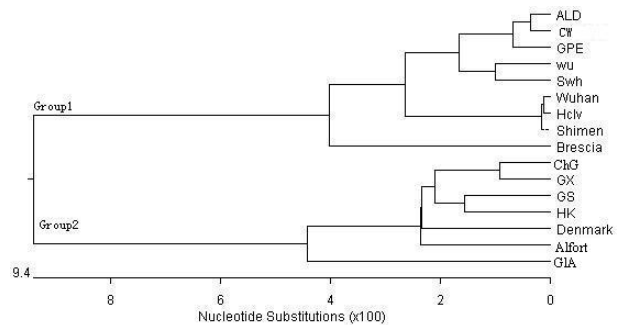


图2 猪瘟病毒株系统发育进化树

### 3 讨论

核苷酸序列分析对国内猪瘟的分子流行病学调查是一个有力的工具,增加不同时间和不同地区野毒株序列分析的数量,对猪瘟野毒的抗原性遗传变异及生态学研究具有十分重要的意义。

E2 基因属中度易变区, Lowings 等<sup>[5]</sup>报道在猪瘟病毒基因组中, E2 基因的序列变异最大为 3.2%~25.0%; E2 基因所编码的 gp55 蛋白是猪瘟病毒的主要保护性抗原。有报道<sup>[6]</sup>认为猪瘟病毒的抗原变异可能是导致该病毒逃逸免疫保护的主要原因。因此, 分析流行毒株 E2 基因的序列, 了解其抗原的变异性, 还可使人们从分子水平上研究猪瘟免疫失败的原因。本研究扩增了猪瘟病毒 E2 基因, 覆盖了 E2 基因上的主要抗原编码区域。通过对这一段序列比较分析发现猪瘟病毒株的多样性和复杂性, 这也是国内目前猪瘟的流行特点之一, 这种多样性和复杂性可能是疫苗接种后产生较低水平免疫保护的原因之一。

E2 基因所编码的 gp55 蛋白空间结构是由 3 个疏水区和 3 个 N 端的链内二硫键构成。在疏水区 3 株流行野毒中只有 Wu 株同石门株氨基酸的差异最小, 在高频突变中和性抗原位点的氨基酸中, Wu 株与石门株有 4 个氨基酸差异, ChG 株和 G1A 株均是 9 个氨基酸有差异。对 gp55 蛋白的抗原性、疏水性及抗原表位预测也发现流行毒株与石门株在保护性抗原上有程度不同的差异。这些差异能否使流行野毒株逃脱中和单抗或免疫血清的中和作用, 是否影响石门株疫苗的免疫保护力,

尚待进一步研究。

从系统发育进化树可知, Wu 株与石门株的亲缘关系较近, 而 ChG 株和 G1A 株已向远离疫苗毒株的方向变化, 但这种主要保护性抗原基因的变异是否会影响疫苗的免疫保护力尚需进一步证实。

#### 参考文献:

- [1] 王在时. 猪瘟防治研究的回顾和展望. 畜禽重大疫病免疫防治研究进展[M]. 北京: 中国农业出版社. 1996. 64-71.
- [2] Meyers G, Rumeapf T, Thil H J. Molecular cloning and nucleotide of the genome of hog cholera virus[J]. Virology, 1989, (171): 555-567.
- [3] Stark R, Rumeapf T, Meyers G, et al. Genomic localization of hog cholera virus glycoproteins[J]. Virology, 1990, (174): 286-289.
- [4] Lowings J P, Paton D J, Sands J J, et al. Classical Swine Fever: genetic detection and analysis of differences between virus isolates[J]. J Gen Virology, 1994, 75: 3461-3468.
- [5] Lowings P, Ibata G, Paton D, et al. Classical Swine Fever Virus diversity and evolution[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 1211-1221.
- [6] 李红卫, 涂长春, 殷震, 等. 异源猪瘟 C 株 E2 基因保护抗原编码区的序列分析与比较[J]. 中国兽医学报, 1996, 18(2): 112-114.

#### · 书讯 ·

## 《兽医临床难病新解》简介

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

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

附言: 该书售价 35 元 / 本 (含包装邮费)。需要者从邮局汇款到湖北省天门市根瘟灵研究所 (马湾) 廖斌发收, 邮编: 431715, 汇单附言栏内注明“难病新解”。

联系电话: 0728-4561354 (兼传真)

手 机: 13872992321 13707222763



# 牛环形泰勒氏焦虫疫苗生产用培养基的筛选

鲁立柱, 王 延, 薛 英, 王玉红, 黄 炯

(新疆天康畜牧生物技术股份有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830032)

**摘 要:** 培养基及原料批次的差异, 对含环形泰勒虫裂殖体的牛血源白细胞连续传代影响较大。使用 DMEM、1640、MEM+0.6%水解乳蛋白三种不同的培养基对含环形泰勒虫裂殖体的牛血源白细胞进行了连续传代比较试验。结果 DMEM 培养基较适应细胞的生长, 连续传代性能优于其它两种培养基, 但成本较高; 1640 培养基较适应悬浮培养, 但细胞增殖率低; 使用 MEM+0.6%水解乳蛋白培养基, 细胞贴壁性好, 但细胞生长性能较差, 连续传代易死亡。

**关键词:** 含环形泰勒虫裂殖体的牛血源白细胞; 培养基

**中图分类号:** S852.65\*3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0033-03

牛环形泰勒虫病流行于我国西北、华北、东北的一些省、区, 是一种季节性很强的地方性流行病。该病多呈急性过程, 发病率、死亡率高, 使养牛业遭受严重的损失。牛环形泰勒氏焦虫疫苗是用含环形泰勒虫裂殖体的细胞接种于适宜培养基培养, 将培养物加明胶保护剂制成, 用于预防牛环形泰勒虫病<sup>[1]</sup>。多年来一直使用 MEM+0.6%水解乳蛋白的培养基配方, 效果良好。但近些年随着原料供应商的更换, 产品质量的不稳定, 影响细胞正常生长, 造成细胞形态变差, 细胞破碎, 致使细胞不能继续传代。就目前情况, 我们选取三组培养基进行对比实验, 以筛选适宜培养基。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞来源** 含牛环形泰勒虫裂殖体的牛血源白细胞由本公司保存。

**1.2 试剂** MEM 培养液和水解乳蛋白为 Hyclone 公司产品, DMEM 培养液和胰酶为 GIBCO 公司产品, 1640 培养液为 SIGMA 公司产品, 血清由兰州民海公司生产, 其它试剂均为分析纯。严格按照说明书使用方法配制培养液, 4℃保存。

**1.3 器材** 倒置显微镜 (OMPLS 公司), CO<sub>2</sub> 培养箱 (Heraeus 公司), 滤器 (PALL 公司), 100 mL 玻璃培养瓶。

### 1.4 细胞培养方法

**1.4.1 细胞复苏** 复苏同批次细胞, 离心去冻存液, 平均分入 6 只培养瓶, 分别使用 MEM+0.6%水

解乳蛋白、DMEM、1640 培养基。血清为同一瓶胎牛血清, 含量均为 10%。每组 2 瓶。放入 CO<sub>2</sub> 培养箱, 按常规培养方法传代<sup>[2]</sup>。

**1.4.2 贴壁时间测定** 每次传代后放入培养箱, 30 min 后每隔半小时镜下观察一次, 确定三组培养基细胞贴壁时间。

**1.4.3 细胞生长及形态观察** 观察传代后未贴壁前、贴壁后的细胞形态, 边缘状况, 细胞内容物状况, 营养液颜色变化。

**1.4.4 传代时间** 细胞传代后到长成致密单层的时间, 以确定细胞生长性能。

**1.4.5 贴壁牢固性** 根据细胞消化下来的时间长短, 判断细胞贴壁性, 以分析细胞活性。

## 2 结果

**2.1 细胞在不同培养基中贴壁情况** MEM+0.6%水解乳蛋白培养基, 细胞贴壁性能稳定; DMEM 培养基细胞很短时间就能吸附于瓶壁, 但不完全贴壁, 随代次增加, 贴壁性能不断增强, 贴壁时间变化不大; 1640 培养基前 3 代不贴壁, 4 代后开始轻微吸附于瓶壁。结果见表 1。

**2.2 细胞在不同培养基中的生长及传代情况** 用 MEM+0.6%水解乳蛋白培养基的细胞始终保持完全伸展的基本形态, 随代次的增加形态逐渐变为边缘不整齐, 细胞内出现空泡、颗粒, 营养液出现大量颗粒物质; 使用 DMEM 培养基, 细胞形态变化较大, 初期保持圆形不伸展, 传至 4 代以后开始

表 1 细胞在不同培养基中贴壁情况

培养代次	F1	F2	F3	F4	F5	F6
MEM+0.6%水解乳蛋白	3.0 h	1.5 h	1.0 h	1.0 h	1.0 h	1.0 h
DMEM	2.0 h	1.0 h	0.5 h	0.5 h	0.5 h	0.5 h
1640	不贴壁	不贴壁	不贴壁	1.0 h	1.0 h	1.0 h

表 2 细胞在不同培养基中的生长情况

培养代次	MEM+0.6%水解乳蛋白	DMEM	1640
F1	平铺、完全伸展、边缘整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清
F2	平铺、完全伸展、边缘整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清
F3	平铺、完全伸展、边缘不整齐, 营养液出现小颗粒	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清
F4	平铺、完全伸展、边缘不清晰, 营养液颗粒增多	伸展、边缘清晰整齐, 营养液澄清	不伸展、圆形、边缘清晰整齐, 营养液澄清
F5	平铺、完全伸展、边缘不清晰, 营养液有大量颗粒, 细胞内出现空泡、颗粒	伸展、边缘清晰整齐, 营养液澄清	轻微伸展、边缘不整齐, 营养液出现少量颗粒
F6	平铺、完全伸展、边缘不清晰, 营养液有大量颗粒, 细胞内出现空泡、颗粒	伸展、边缘不整齐, 营养液出现少量颗粒	轻微伸展、边缘不清晰不整齐, 营养液出现大量颗粒

表 3 细胞能够进行传代的时间

培养代次	F1	F2	F3	F4	F5	F6
MEM+0.6%水解乳蛋白	24 h	20 h	28 h	36 h	48 h	48 h
DMEM	24 h	20 h	24 h	24 h	24 h	24 h
1640	36 h	40 h	40 h	48 h	60 h	72 h

表 4 细胞所需的消化时间

培养代次	MEM+0.6%水解乳蛋白	DMEM	1640
F1	贴壁良好、消化 2 min	轻度粘附不用消化吸管轻微吹打可脱壁	不贴壁不用消化
F2	贴壁良好、消化 2 min	轻度粘附不用消化吸管轻微吹打可脱壁	不贴壁不用消化
F3	贴壁良好、消化 2 min	轻度粘附不用消化吸管轻微吹打可脱壁	不贴壁不用消化
F4	贴壁良好、消化 2 min	贴壁、消化 0.5 min	不贴壁不用消化
F5	贴壁良好、消化 2 min	贴壁、消化 0.5 min	轻度粘附不用消化吸管轻微吹打可脱壁
F6	贴壁良好、消化 2 min	贴壁、消化 0.5 min	轻度粘附不用消化吸管轻微吹打可脱壁

逐渐伸展平铺于瓶壁, 随代次增加细胞内也出现空泡、颗粒, 营养液中颗粒物质较少; 1640 培养基 4 代前基本保持圆形, 不伸展, 传至 5 代后开始出现轻微的伸展, 细胞边缘不整齐, 营养液出现大量颗粒。结果详见表 2。

MEM+0.6%水解乳蛋白培养基初期生长旺盛, 24 h 就长成致密的单层, 随代次增加, 生长性能不断下降, 5 代后基本维持在 48 h 才能长成单层甚至更长时间; DME 培养基生长性能较稳定, 传代时间保持在 24 h 左右; 1640 培养基传代时间

变化较大, 6 代后细胞基本停止生长。结果见表 3。

**2.3 MEM+0.6%水解乳蛋白培养基消化时间**保持在 2 min 左右; DMEM 培养基前期细胞主要是吸附, 不用消化, 轻微吹打即可脱壁, 4 代后开始贴壁需短时间消化; 1640 培养基前期不贴壁, 无需消化, 后期使用吸管轻微吹打即可脱壁。结果见表 4。

### 3 讨论

由于大生产使用悬浮培养方式, 主要设备使用美国 NBS 公司生产的 14 L 生物反应器, 悬浮培养具有单批次细胞产量高的特点, 操作方便, 劳动

强度低,便于生产。细胞的悬浮性能强,便于悬浮条件下生长,易于生物反应器的生产。所以在种子制备中需要选择贴壁性较弱,生长速度快,传代时间短的细胞作种子细胞,以适应大生产中悬浮培养的需要。

由上述结果可以看出, MEM+0.6%水解乳蛋白培养基的细胞组,贴壁良好,初期形态较正常,但随着传代次数的增多,细胞形态变差,边缘模糊,细胞内出现大量的空泡和颗粒,营养液中有大量细胞碎片,传代时间越来越长,细胞活性变差,传到10代左右细胞不再增值。使用DMEM培养基的细胞组,初期细胞贴壁性差,细胞基本不伸展,呈圆形粘附于瓶壁,增值速度快,活性高,连续传代次数较高。使用1640培养基的细胞组,几乎无贴

壁性,传代时间长,生长增值速度极慢,传至6代以后细胞迅速凋亡。

综上所述,细胞在三种培养基中培养比较,DMEM培养基较好。1640营养液较适宜悬浮培养,但细胞增值率过低,连续传代性差。MEM+0.6%水解乳蛋白培养液虽成本较低,使用方便,但细胞密度过低,无法满足生产需要。因此还应对各培养基进行筛选试验,以寻求最好的培养结果。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[S]. 2000版.
- [2] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004.

## 粤召开全省《动物防疫法》培训班 部署重大动物疫病防控工作

4月9日,广东省农业厅、畜牧兽医局在广州组织举办全省《动物防疫法》培训班,学习了解《动物防疫法》各项制度和实质,研究部署下阶段重大动物疫病防控工作。国务院法制办农林司王振江司长、中国动物疫病预防控制中心徐百万副主任亲临现场授课。省农业厅副厅长、畜牧兽医局局长陈福林在会上作动员讲话,并对全省下阶段重大动物疫病防控工作进行了部署。

当前,我省正处在破解体制机制难题,推动动物防疫事业大发展的关键时期。《动物防疫法》的修订实施,是推动依法行政,实现依法防疫的重要举措,是我国动物防疫工作中的一件大事。陈福林副厅长要求,各地务必站在全局和战略的高度,统一思想,充分认识学习贯彻实施《动物防疫法》的重大意义。加强学习,准确把握《动物防疫法》的各项制度,着力提高依法行政、依法防疫本领,加大宣传力度,强化督查,扎实开展重大动物疫病防控工作。

陈福林副厅长就全省下阶段重大动物疫病防控工作进行了部署。他指出,当前正值春季动物防疫的关键时期,防控任务十分繁重。各地要加强领导落实措施,为各项工作提供有力保障,精心组织,周密部署,进一步提高队伍素质,加大重大动物疫病防控力度,强化兽药监管,保障动物性食品质量安全。他强调,各地要以贯彻实施《动物防疫法》为契机,以思想大解放,推动全省动物防疫工作再上新台阶,为发展现代畜牧业,保障人民群众身体健康,维护社会和谐稳定做出新的更大的贡献。

国务院法制办农林司王振江司长和中国动物疫病预防控制中心徐百万副主任分别在会上进行了现场授课。国务院法制办农林司王振江司长对新《动物防疫法》各条款的修订过程、内涵意义以及如何运用等作了深刻的阐述。中国动物疫病预防控制中心徐百万副主任对《动物防疫法》的管理体系设置、调整范围、基本制度以及保障措施等进行了详细介绍。

据了解,新《动物防疫法》共10章84条,与原法相比增加了3章26条,在总结近年来重大动物疫病防控实践经验的基础上,重点对免疫、检疫、疫情报告和处理等制度作了补充和完善,新增加了疫情预警、风险评估、疫情认定、无规定动物疫病建设、官方兽医、执业兽医管理、动物防疫保障机制等制度,基本上解决了当前动物防疫工作中的主要问题,是依法防控动物疫病的重要法律武器。

(信息来源:<http://www.gd.agri.gov.cn/>)

# 两株死胎源猪圆环病毒 II 型的分离与序列分析

周庆丰<sup>1</sup>, 陈峰<sup>2</sup>, 吴德铭<sup>1</sup>, 苏润环<sup>1</sup>, 陈靳松<sup>1</sup>, 宋延华<sup>1</sup>, 毕英佐<sup>2</sup>

(1. 广东省温氏集团研究院, 广东 新兴 527400; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 将两猪场 II 型猪圆环病毒 (PCV2) 核酸阳性的流产死胎病料, 接种猪肾传代细胞 PK15, 成功分离到 2 株 PCV2。利用 1 对 PCV2 特异性引物, 成功扩增出这 2 株 PCV2 长约 1 700 bp 的全基因组序列, 并与其他 PCV2 毒株序列进行相似性比较。结果表明: 2 个分离株全基因组长度均为 1 767 bp, 核苷酸序列相似性为 99.9%; ORF2 基因核苷酸相似性为 99.85%, 所编码的衣壳蛋白氨基酸序列相似性为 100%; 2 个分离株与 SD-3 等国内分离株核苷酸序列的相似性较高, 最高可达 99.9%。

**关键词:** II 型猪圆环病毒; 分离; 序列分析

**中图分类号:** S852.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0036-04

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 是圆环病毒科圆环病毒属成员, 是一种无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒, 呈二十面体对称, 病毒粒子直径约 17~20 nm, 是迄今已知的最小的动物病毒之一。目前为止已发现两种血清型, 即猪圆环病毒 I 型 (porcine circovirus 1, PCV1) 和猪圆环病毒 II 型 (porcine circovirus 2, PCV2)。PCV1 基因组长 1 759 bp, PCV2 病毒基因组长 1 767 bp 或 1 768 bp。PCV1 多认为无致病性, 广泛存在于猪源细胞及健康猪群中。PCV1 由 Tischer 等<sup>[1]</sup> 于 1974 年作为一种 PK15 细胞污染物首先报道, 后来被证实为一种新的病毒。PCV2 与猪群中发生的许多临床疾病密切相关, 包括断奶仔猪多系统衰竭综合征、猪皮炎肾病综合征、猪呼吸道疾病复合征、繁殖障碍、消化道疾病及仔猪先天性震颤等, 已给各国养猪业造成了巨大的经济损失。这类与 PCV 相关的疾病, 有学者建议统称为猪圆环病毒病 (porcine circovirus diseases, PCVD)<sup>[2]</sup>。

国内自郎洪武等 2000 年关于 PCV2 的血清学检测报道以来, 全国大部分地区都有关于 PCV2 感染的病例报告, PCVD 对养猪业的危害已经非常严重<sup>[3-5]</sup>。本研究对发生母猪繁殖障碍的猪场进行 PCV2 分离及全基因组序列分析, 以期获得相关的分子流行病学数据, 为探索 PCV2 相关疾病的致病机理、筛选疫苗毒株和制定综合防控措施提供依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 样品来源** 流产死胎样品 1 于 2007 年 3 月

从广东省开平市发生繁殖障碍的某猪场采集, 样品 2 于 2006 年 12 月从海南儋州市发生繁殖障碍的某猪场采集。2 份样品经 PCR 检测为 PCV2 核酸阳性, PPV、PRRSV、CSFV 和 PRV 等病毒核酸均为阴性。

**1.2 质粒、菌种和细胞** pBluescript SK(-) (pBssk) 为 stratagene 公司产品, 由华南农业大学家禽研究室保存。无 PCV1 污染的 PK15 细胞和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由广东省温氏集团研究院保存。

**1.3 试剂** 1640 细胞培养基、新生牛血清和胰蛋白酶等细胞培养试剂, 均购自 Invitrogen 公司。T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、限制性内切酶 Sac II、高保真 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、dNTPs、小牛肠碱性磷酸酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品。质粒抽提试剂盒和 DNA 片段凝胶快速回收试剂盒购自 Omega 公司。组织基因组 DNA 抽提试剂盒为 TIANGEN 公司产品。其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

**1.4 引物的设计与合成** 参考国外已发表文献<sup>[6]</sup>, 设计合成一对扩增 PCV2 全基因组的特异性引物 PCVF: 5'-GAACCGGGGCTGGCTGAACCTTTGAAAGT-3'; PCVR: 5'-GCACCGGAAATTTCTGACAAACGTTACA-3'。此对引物 5' 端均包含一个 Sac II 位点 (下划线)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

**1.5 病毒分离** 无菌采集流产死胎的心肌、脾脏、肺脏, 研磨制成 1:5 悬液, 反复冻融 3 次, 4 000 rpm 离心 30 min, 取上清液, 加入青霉素 1 000 U/mL, 链霉素 1 000  $\mu$ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 作用 5 h。接

种于将形成单层的 PK-15 细胞,同时设空白对照,37℃ 吸附 1 h, 然后加入含有 2% 新生牛血清的 1640 细胞维持液。在 37℃ 培养 24 h。倒掉细胞培养基, 用含 300 mmol/L D- 氨基葡萄糖处理 30 min, 弃去 D- 氨基葡萄糖, 用无菌的 10 mmol/L pH 7.4 PBS 洗涤 2 次, 然后加入含 2% 新生牛血清的细胞维持液, 在 37℃ 继续孵育 48~72 h。盲传 10 代。按常规方法收获病毒液。

**1.6 PCR 模板的制备和病毒基因组的 PCR 扩增** 将收获病毒液冻融 3 次, 以 5 000 rpm 离心 10 min。取上清液 200 μL, 用 TIANGEN 公司的血液、组织和基因组 DNA 抽提试剂盒抽提 DNA, DNA 沉淀溶解于超纯水中。在 PCR 管中加入 PrimeSTAR DNA 聚合酶 5 × PCR 缓冲液 10 μL、10 mmol/L dNTP 4 μL、上游引物 PCVF 1 μL、下游引物 PCVR 1 μL、模板 2 μL 和 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶 0.5 μL, 加超纯水补至 50 μL。置 PCR 仪上按下述条件进行扩增: 98℃ 10s, 56℃ 30s, 72℃ 2 min, 共进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳鉴定。同时进行 PPV、PRRSV、CSFV 和 PRV 等病毒核酸检测。

**1.7 基因组的克隆与序列分析** 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 割胶纯化基因组 DNA 片段。将纯化的 PCR 产物和 pBssk 质粒分别用限制性内切酶 Sac II 进行酶切, 凝胶纯化 PCR 酶切产物和质粒酶切产物。将质粒酶切产物用 CIAP 碱性磷酸酶处理, 然后将纯化的 PCR 酶切产物和质粒酶切产物用 T4 DNA 连接酶进行连接反应。连接反应产物转化 DH5 α 大肠杆菌。37℃ 恒温培养过夜。挑取单个菌落, 接种于含氨苄青霉素 (50 μg/mL) 的液体 LB 培养基中振荡培养。提取质粒, 用 Sac II 酶切鉴定。经 PCR 和酶切鉴定正确的克隆送宝生物工程 (大连) 有限公司进行序列测定。

用 DNASTar 软件对病毒基因组序列进行比对, 并运用 Blast 程序与 GenBank 中的 PCV2 毒株的全基因组序列进行比较。同时对毒株的 ORF2 基因序列进行翻译, 推导出氨基酸序列, 与其他 PCV2 病毒的同源性进行分析。

## 2 结果与分析

**2.1 病毒分离** 病毒在 PK-15 细胞上不出现细胞病变。收集第 10 代病毒分离物进行 RT-PCR 检测, 结果 2 份分离物均为 PCV2 核酸阳性, PPV、

PRRSV、CSFV 与 PRV 等病毒核酸均为阴性。初步检测结果表明已经成功分离到 2 株 PCV2, 分别命名为 GD2007 和 HN2006。

**2.2 PCV2 全基因组的 PCR 扩增** 以分离毒株 GD2007 和 HN2006 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCV2 全基因组 PCR 扩增。电泳结果显示, 2 个分离毒株均在约 1700 bp 处有特异性扩增带 (见图 1), 与预期的扩增片段大小相符。初步表明用 PCR 方法获得的扩增片段为 PCV2 全基因组片段。

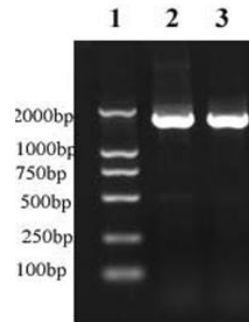


图 1 PCV2 全基因组的 PCR 扩增

1: DNA 分子质量标准; 2: HN2006 株的 PCR 扩增产物;  
3: GD2007 株的 PCR 扩增产物

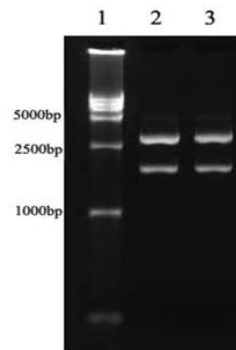


图 2 PCV2 全基因组重组质粒的酶切鉴定

1: DNA 分子质量标准; 2: pBssk-HN 重组质粒被 Sac II 酶切的产物; 3: pBssk-GD 重组质粒被 Sac II 酶切的产物

**2.3 重组质粒的构建及酶切鉴定** 纯化的 PCR 产物转化大肠杆菌 DH5 α, 提取质粒, 酶切鉴定。酶切鉴定结果显示, 2 个毒株 GD2007 和 HN2006 均获得了阳性重组克隆, 每个重组质粒酶切产物均得到 1 条约 3 kb 和 1 条约 1.7 kb 的 DNA 条带 (见图 2), 与预期结果一致。将获得的阳性重组质粒分别命名为 pBssk-GD 和 pBssk-HN。

**2.4 病毒全基因组的核苷酸序列测定与分析** 分别测定重组质粒 pBssk-HN 和 pBssk-GD 插入片段的核苷酸序列, 获得了 2 个毒株 GD2007 和 HN2006 的全基因组核苷酸序列 (见图 3)。测序结

```

1 ACCAGCGCAC TTCGGCAGCG GCAGCACCTC GGCAGCACCT CAGCAGCAAC ATGCCAGCA
61 AAAAGAATGG AAGAAGCGGA CCCCAACCAC AAAAAAGGTG GGTGTTACAG CTGAATAATC
121 CTTCCGAGGA CGAGCGCAAG AAAATACGGG AGCTTCCAAT CTCCCTTTT GATTATTTTA
181 TTGTTGGCGA GGAGGGTAAT GAGGAAGGAC GAACACCCCA CCTCCAGGGG TTCGCTAATT
241 TTGTGAAGAA GCAAACATTT AATAAAGTGA AATGGTATTT CGGTGCCCGC TGCCACATCG
301 AGAAAGCGAA AGGAACTGAT CAGCAGAATA AAGAATATTG CAGTAAAGAA GGCAACTTAC
361 TGATTGAATG TGGAGCTCCT AGATCTCAAG GACAACGGAG TGACCTGTCT ACTGCTGTGA
421 GTACCTTGCT GGAGAGCGGG AGTCTGGTGA CCGTTGCAGA GCAGCACCTT GTAACGTTTG
481 TCAGAAATTT CCGCGGGCTG GCTGAACTTT TGAAAGTGA GGGGAAAATG CAGAAGCGTG
541 ATTGGAAGAC TAATGTACAC GTCATTGTGG GGCCACCTGG GTGTGGTAAA AGCAAATGGG
601 CTGCTAATTT TGCAGACCCG GAAACCACAT ACTGGAAACC ACCTAGAAAAC AAGTGGTGGG
661 ATGGTTACCA TGGTGAAGAA GTGGTTGTTA TTGATGACTT TTATGGCTGG CTGCCCTGGG
721 ATGATCTACT GAGACTGTGT GATCGATATC CATTGACTGT AGAGACTAAA GGTGGAAGCTG
781 TACCTTTTTT GGCCCGCAGT ATTCTGATTA CCAGCAATCA GACCCCGTTG GAATGGTACT
841 CCTCAACTGC TGTCACGCT GTAGAAGCTC TTTATCGGAG GATTACTTCC TTGGTATTTT
901 GGAAGAATGC TACAGAACAA TCCACGGAGG AAGGGGGCCA GTTCGTAACC CTTTCCCCC
961 CATGCCTGA ATTTCCATAT GAAATAAATT ACTGAGTCTT TTTTACTACT TCGTAATGGT
1021 TTTTATTATT CATTAAAGGT TAAGTGGGGG GTCTTTAAGA TTAAATTCTC TGAATTGTAC
1081 ATACATGGTT ACACGGATAT TGTATTCCTG GTCGTATATA CTGTTTTCGA ACGCAGTGCC
1141 GAGGCCTACG TGGTCTACAT TTCCAGCAGT TTGTAGTCTC AGCCACAGCT GATTCTTTTT
1201 GTTGTTTGGT TGAAGTAAT CAATAGTGA ATCTAGGACA GGTTGGGGG TAAAGTAGCG
1261 GGAGTGGTAG GAGAAGGGCT GGGTTATGGT ATGGCGGGAG GAGTAGTTA CATAGGGGTC
1321 ATAGGTGAGG GCTGTGGCCT TTGTTACAAA GTTATCATCT AGAATAACAG CACTGGAGCC
1381 CACTCCCCTG TCACCCTGGG TGATCGGGGA GCAGGGCCAG AATTCAACCT TAACCTTTCT
1441 TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG GGGGTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA
1501 GTCATTAATA TTGAATCTCA TCATGTCCAC CGCCAGGAG GGCCTTCTGA CTGTGGTTCTG
1561 CTTGATAGTA TATCCGAAGG TGCGGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTTCTTTCT
1621 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA TCTGGCCAAG
1681 ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCCG GTAACGCCTC CTTGGATACG TCATATCTGA
1741 AAACGAAAGA AGTGGCGTGT AAGTATT

```

图3 PCV2分离株HN2007的全基因组序列

注:粗体字和下划线表示PCV2分离株GD2007的基因组947位为C,1594位为T

果表明,2个PCV2基因组长度均为1 767 bp,只有两个碱基的差异。一是毒株GD2007 1 594位碱基为G,而HN2006为T,该突变位于ORF2的47位氨基酸残基的第三位密码子,属于无意义突变;二是GD2007 947位碱基为A,而HN2006为C。2个毒株ORF2的核苷酸及氨基酸序列均为702 bp,编码234个氨基酸,核苷酸相似性为99.85%,氨基酸序列相似性为100%。

与GenBank中收集的PCV2序列进行此对分析,结果表明2个分离株基因组序列与国内毒株和荷兰、丹麦以及法国等欧洲分离株同源性较高。与国内分离株SD-3(EU366323)、GXHZ-4(EF675233)、

BJ0504(EF524530)、QY(AY682995)基因的序列相似性均在99%以上,与国外毒株DK442case(EF565354)、NL\_PMWS\_1(AY484413)、Fd1(AY322000)之间的相似性在98%以上。序列比较结果表明,2个分离株均属于PCV2b基因型<sup>[7]</sup>。

### 3 讨论

研究表明,PCV2感染可能是与胎儿死亡和新生仔猪高死亡率密切相关的重要病原<sup>[8,9]</sup>。本研究证实PCV2可能是广东、海南等地某些猪场发生繁殖障碍的主要病因之一。

PCV2基因组比较保守,不同地区分离的PCV2同源性很高。但Lefebvre等运用单克隆抗体对不

同临床表现的 PCV2 毒株进行抗原性比较, 发现尽管 PCV2 基因组较保守, 但具有不同遗传和临床背景 PCV2 毒株在衣壳蛋白水平上还是存在明显的抗原性差异<sup>[10]</sup>。也有人推测不同症状的 PCV 感染可能与 PCV2 的 ORF2 基因变异有关。本研究扩增了 2 株不同地区流产死胎样品中的 PCV2 基因组序列, 它们高度保守, 只存在两个碱基的差异; 2 株 PCV2 基因组序列除与国内流行毒株同源性较高, 与欧洲流行毒株基因序列相似性也高达 98% 以上。

#### 参考文献:

- [1] Tischer H, Vettermann W, Hoch M A. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms[J]. Arch Virol, 1995, (140): 737-743.
- [2] Allan G M, McNeilly F, Meehan B, et al. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2[J]. Vet Rec, 2002, 150(8): 255-256.
- [3] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(3): 3-5.
- [4] 刘秀清, 宁金友, 赵荣茂, 等. 西宁市猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 162-165.
- [5] 王宪文, 曹永长, 马静云, 等. 猪圆环病毒Ⅱ型广东分离株全基因组的克隆和序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 05-08.
- [6] Fenaux M, Halbur P G, Haqshenas G, et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions[J]. J Virol, 2002, 76(2): 541-51.
- [7] Jemer ic L, Cvetnic Š, Toplak I, et al. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from Croatia[J]. Res Vet Sci, 2004, 77(2): 171-175.
- [8] Allan G M, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material[J]. Vet Microbiol, 1995, (44): 49-64.
- [9] Brunborg I M, Jonassen C M, Moldal T, et al. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study[J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 19(4): 368-375.
- [10] Lefebvre D J, Costers S, Van Doorselaere J, et al. Antigenic differences among porcine circovirus type 2 strains, as demonstrated by the use of monoclonal antibodies[J]. J Gen Virol, 2008, 89(Pt1): 177-187.

## 2008“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, 经广东省畜牧兽医学会七届六次常务理事扩大会议研究决定, 在《广东畜牧兽医科技》杂志中评选 2008 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 2009 年第 1 期公布。

- 1、**评选范围:** 本刊 2008 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  
二〇〇八年一月二十六日

# 小鼠体内卵母细胞死亡的形态变化研究

彭礼繁<sup>1</sup>, Eun-A LIM<sup>2</sup>, Tae-Saeng CHOI<sup>2</sup>, 罗光彬<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室, 辽宁 沈阳 110161; 2. 韩国 Dankook 大学医学院微生物系, 忠南 韩国)

**摘要:** 目前大多数研究主要是针对体外的卵母细胞凋亡, 并且通常采用抗癌试剂来人为的引入。然而, 对体内卵母细胞死亡的过程还不是很明确。为了查明体内未受精卵的死亡过程, 我们检测了从输卵管壶腹部冲出的注射了 HCG 后不同间隔的卵母细胞中的细胞化学物质的改变情况。在每一个收集的时间段, 在显微镜下将收集的卵母细胞从表观上分成四组: 单细胞卵母细胞 (没有激活和没有核或胞浆移动), 激活的卵母细胞 (带有核的单细胞, 2- 或 4- 细胞), 碎裂的卵母细胞及其死亡的卵母细胞。随着时间的推移, 单细胞卵母细胞的数量下降, 死亡的卵母细胞数量增加, 但是激活或碎裂的卵母细胞数量未发生改变。同时, 检测到的大多数死亡的卵母细胞都是单细胞。在每一个时间点上, 用抗微管蛋白抗体对单细胞卵母细胞进行着色, 来检测它们的纺锤体状态。在注射 HCG 24 h 之后, 大多数超排后的卵母细胞都有两极纺锤体, 然而在超排后 64h 的单细胞卵母细胞就没有纺锤体。结果表明, 大多数的体内卵母细胞在单细胞期就出现死亡, 而激活或碎裂的卵母细胞则不是。

**关键词:** 卵母细胞; 碎裂; 形态; 凋亡

**中图分类号:** S852.69

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0040-04

动物体内大多数细胞都有生命周期, 因此, 功能脆弱的细胞被新的细胞替代并且完成它们的生理功能。超排后的卵母细胞除非在有限的时间里完成受精, 否则它们将在输卵管里经历产生、消失和被替代的过程。这个过程能够防止脆弱的超排卵母细胞的受精, 同时它也能产生健康的胚胎和后代。被替代的机制由下述两个过程所引发: 坏疽和凋亡<sup>[1]</sup>。这个凋亡的过程可以由来自于核的凋亡体形态上的改变和细胞质的碎裂<sup>[2]</sup>及其前凋亡蛋白的上调节和抗凋亡蛋白的下调节的生化特征来检测<sup>[3]</sup>。

从先前的研究中, 我们可以看出卵母细胞的死亡是由凋亡的过程所引起的<sup>[4]</sup>。有一些与凋亡相关的基因在人卵母细胞中已经被检测到<sup>[5]</sup>, 抑制蛋白的激活和核的碎裂在鼠卵母细胞中也已得到证实<sup>[6]</sup>。同时, 由化学治疗剂所引发的卵母细胞凋亡在缺乏 2- 抑制蛋白和酸性神经磷脂酶的鼠中发生了抑制作用<sup>[7,8]</sup>, 同时也由在卵巢中的抗凋亡蛋白 Bcl2 来充分表达<sup>[9]</sup>。先前关于卵母细胞的表型观察的研究已显示出卵母细胞的凋亡与细胞质的碎裂密切相关<sup>[10,11]</sup>。大多数关于卵母细胞死亡的研究主要是在体外进行的, 并且死亡是人为的引入抗癌试剂所引起的<sup>[4,7,9]</sup>。在目前的研究中,

我们通过检测注射 HCG 16、24、40、48、64 h 后, 从输卵管收集到的卵母细胞的细胞生物学改变, 来了解体内未受精卵母细胞的死亡过程。我们将卵母细胞从表型上分成四组来观察它们的外型改变情况。同时, 单细胞卵母细胞用抗微管蛋白的抗体来抑制免疫反应, 我们对它们的纺锤体状况将做出评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 21-23 日龄的昆明系小鼠, 雌性, 购自大连医科大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(辽)2004-0003。

**1.1.2 仪器设备** 荧光显微镜(VANOX-1000), 日本 OLYMPUS 公司产品; 生物显微镜附显相系统(JVC KY-1900E), 日本 OLYMPUS 公司产品; CO<sub>2</sub> 培养箱(BB5060UV), 香港生产; 倒置显微镜及显微操作系统(DMIRB), 德国 Leica 公司产品; 实体生物显微镜(M37610-26), 日本 OLYMPUS 公司产品。

**1.1.3 药品与试剂** 孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、改良 Whitten 培养基、牛血清白蛋白, TritonX-100 及 Tween-20 等均购于 Sigma 公司。多聚甲醛, 沈阳化学试剂厂生产。



## 1.2 方法

**1.2.1 卵母细胞的收集** 为了获得超排的卵母细胞,对小鼠注射 PMSG 5 IU/只,间隔 48 h 之后注射 HCG 5 IU/只。在注射 HCG 16 h 后从输卵管的壶腹部收集新鲜的超排后的卵母细胞。卵丘细胞放在含有 0.1% (w/v) 透明质酸酶的改良 Whitten 培养基<sup>[12]</sup>中 2 min。其他的卵母细胞在注射 HCG 24、40、48、64 h 后从卵巢中获得。改良 Whitten 培养基中含有 0.4% 牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.1% 的透明质酸酶,在使用前平衡到 37℃。

**1.2.2 卵母细胞的分类** 在显微镜下,将卵母细胞分成四组: (1) 没有激活和没有核或胞浆移动的单细胞卵母细胞; (2) 单细胞或分化后带有核的 2 或 4 细胞的激活卵母细胞; (3) 含有超过 4 个不均匀细胞的碎裂卵母细胞; (4) 颜色发暗或有模糊的胞质膜的死亡卵母细胞。

**1.2.3 卵母细胞的着色** 收集到的卵母细胞用含有 1.8% (w/v) 多聚甲醛的 PBS (pH 7.4) 在室温下 (20~25℃) 固定 40 min,再用 1% (v/v) Triton X-100 的 PBS 中渗透作用 20 min。把卵母细胞放在 0.1% (v/v) Tween-20 的 PBS 中清洗 20 min,接着放在含有 3% (w/v) BSA 的 PBS 中培养 1 h。把这些卵母细胞培养在含有抗微管蛋白抗体的 1:100 稀释液中,接着又培养在含有荧光素共轭硫氰酸的次抗体的 1:40 稀释液中。再用 DAPI 对卵母细胞联合固定使 DNA 显现<sup>[13]</sup>。然后,用荧光显微镜来观察免疫抑制的卵母细胞。

## 2 结果

在本次试验中,我们使用未性成熟的小鼠来获得新鲜的超排后的卵母细胞,排除掉在细胞末期获得的超排后的卵母细胞的可能性。注射 HCG 16 h 后从膨胀的输卵管壶腹部收集新鲜的超排后的卵母细胞。同时,其他时间段的卵母细胞分别在注射 HCG 24、40、48、64 h 后从卵巢中获得。在注射 HCG 16、24、40 h 后,收集到的卵母细胞数量没有差异,但是在注射 HCG 48 h 和 64 h 后,收集到的卵母细胞数量有显著性的差异 (表 1)。在每一个时间点所收集到的卵母细胞都用透明质酸酶处理获得,并且在显微镜下观察形态变化。图 1 显示了在显微镜下观察到的四种不同的卵母细胞形态。正如在“材料与方法”中所提到的,分裂均匀

的 2- 或 4- 细胞期并且有核的卵母细胞被归为激活组。有模糊的胞质膜的归为死亡的卵母细胞,它与单细胞、激活和碎裂的卵母细胞组作对照。

如表 2 中所示,随着时间的推移,单细胞卵母细胞数在下降而死亡的卵母细胞数在上升。在注射 HCG 40 h 后,首先观察到死亡的卵母细胞;在注射 HCG 48 h 后,死亡的卵母细胞的数量上升到 52%。但是,激活和碎裂的卵母细胞数在观察中没有显著性改变。大多数死亡的卵母细胞都停留在单细胞期 (表 2),但是有一些死亡的卵母细胞已经被激活或发生碎裂。用抗微管蛋白抗体着色的单细胞卵母细胞能够检测到它们的纺锤体的状态。图 2 显示了正常的两极纺锤体,不正常的半纺锤体和没有纺锤体的细胞。不正常的纺锤体状态包括脆弱的纺锤体和星形的微管<sup>[14]</sup>。随着时间的推移,纺锤体的结构在逐渐消失;在注射 HCG 40 h 后,62% 的单细胞卵母细胞不正常或没有纺锤体,在注射 HCG 40 h 后,80% 的单细胞卵母细胞也存在这种情况。

卵母细胞用抗微管蛋白 YL1/2 抗体和 DAPI 着色。箭头所示的是用 DAPI 着色的染色体。新鲜的超排卵母细胞有正常的两极化纺锤体 (a),但是单细胞卵母细胞 (没有激活) 有半个纺锤体 (b) 或随着 HCG 注射时间的增加没有出现纺锤体 (c)。

表 1 注射 HCG 后不同时间段从输卵管获得的卵母细胞数

注射 HCG 后的时间 (h)	从六只不同小鼠获得的卵母细胞数	卵母细胞的平均数
16	130	21.0±2.9
24	102	16.3±3.6
40	99	15.8±5.5
48	70	11.0±2.2
64	39	5.8±2.5

## 3 讨论

总体来说,实验用小鼠的发情期有 4~5 天的间隔。在这个时间段,未受精的卵母细胞肯定会被替代掉,以确保精子与新排出卵母细胞的结合。在本实验中,与在注射 HCG 16、24、40 h 后的相比,在注射 HCG 48、64 h 后从输卵管冲出的卵母细胞数量明显下降。这就说明了大多数输卵管中的死亡卵母细胞发生在 48 h 以后。在本次的体内研究中,在注射 HCG 40 h 后首先观察到死亡的卵母细胞。在这个时间段以后,死亡率迅速上升。在体外

表 2 注射 HCG 后在不同时间段里四种不同形态的卵的比例

注射 HCG 后的时间(h)	卵母细胞数	单细胞卵母细胞不正常或没有纺锤体的卵母细胞 / (没有激活)单细胞卵母细胞 (%)	激活的卵母细胞 (%)	碎裂的卵母细胞 (%)	死亡的卵母细胞单细胞 / 死亡的卵母细胞 (%)
16	186	178 (94) 0 / 178 (0)	2 (1)	5 (2)	0 (0)
24	173	166 (94) 0 / 166 (0)	3 (2)	3 (2)	0 (0)
40	185	117 (62) 72 / 117 (61)	14 (8)	9 (5)	40 (21) 38 / 41 (93)
48	163	59 (35) 47 / 59 (79)	12 (7)	4 (2)	83 (51) 77 / 84 (92)
64	84	9 (12) 10 / 10 (100)	8 (9)	11 (13)	50 (59) 45 / 51 (88)

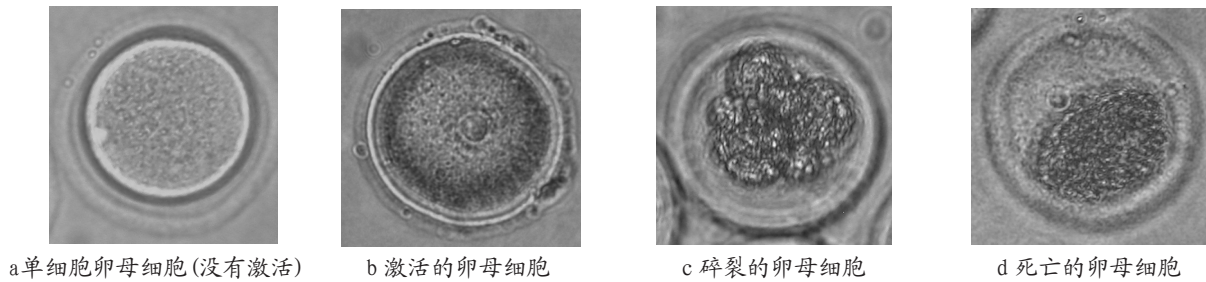


图 1 在显微镜下观察到的四种形态

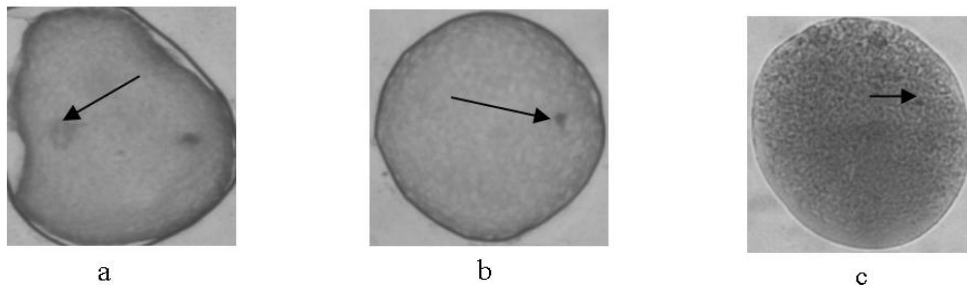


图 2 单细胞卵母细胞 (没有激活) 的不同纺锤体形态

培养基中,死亡的卵母细胞在注射 HCG 96 h 后首先观察到。这就说明了有些因素或者输卵管中的物质加速了卵母细胞的死亡。卵母细胞的碎裂或激活并不是它们死亡的必备条件, 因为在我们研究的时间段, 碎裂或激活的卵母细胞数没有显著性的差异。同样, 在本实验中观察到的死亡卵母细胞大多数是单细胞卵母细胞 (表 2)。先前的研究也说明了抑制蛋白能够抑制卵母细胞的凋亡但不能抑制它的碎裂<sup>[6]</sup>。

在超排后的鼠卵母细胞中, 我们观察到了不正常的纺锤体, 其中包括短小或半个纺锤体<sup>[14]</sup>。在我们的研究中, 有 62% 的单细胞卵母细胞在注射 HCG 40 h 后存在半个或没有纺锤体, 同时有 80% 的单细胞卵母细胞在注射 HCG 48 h 后没有纺锤体。这也说明了不正常的纺锤体包括半个纺锤体,

这些都是卵母细胞消亡的一个过程。体内卵母细胞形态的改变说明了卵母细胞的死亡发生在单细胞卵母细胞期, 而不是在激活或碎裂期后。同时, 来自于单细胞卵母细胞消亡的纺锤体可能与卵母细胞的死亡过程密切相关, 和它们的激活或碎裂关系不大。在对哺乳动物的一项研究中也说明了细胞骨架的破裂加速了 3- 抑制蛋白的激活<sup>[15]</sup>。

参考文献:

[1] Buja L M, Eigenbrodt M L, Eigenbrodt E H. Apoptosis and necrosis basic types and mechanisms of cell death [J]. Arch Pathol Lab Med, 1993, (117):1208-1214.  
 [2] Kerr J FR, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, (26):239-257.  
 [3] Zimmermann K C, Bonzon C, Green D R. The machinery of

programmed cell death[J]. Pharmacol Ther, 2001, (92): 57-70.

[4] Perez G I, Tao X J, Tilly J L. Fragmentation and death (a.k.a apoptosis) of ovulated oocytes[J]. Mol Hum Reprod, 1999, (5):414-420.

[5] Liu H C, He Z Y, Mele C A, et al. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos[J]. Assist Reprod Genet, 2000, (17):521-533.

[6] Xu J S, Cheung T M, Chan S T, et al. The incidence of cytoplasmic fragmentation in mouse embryos in vitro is not affected by inhibition of caspase activity[J]. Fertil Steril, 2001, (75):986-991.

[7] Bergeron L, Perez G I, Macdonald G, et al. Defects in regulation of apoptosis in caspases-2-deficient mice [J]. Genes Dev, 1998, (12):1304-1314.

[8] Morita Y, Perez G I, Paris F, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy[J]. Nature Med, 2000, (6):1109-1114.

[9] Moriota Y, Perez G I, Maravei D V, et al. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro[J]. Mol Endocrinol, 1999, (13):841-850.

[10] Takase K, Ishikawa M, Hoshiai M, et al. Apoptosis in the degeneration process of unfertilized mouse ova [J]. Tohoku J Exp Med, 1995, (175):69-76.

[11] Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, et al. DNA fragmentation of oocyte in aged mice[J]. Hum Reprod, 1996, (11):1480-1483.

[12] Katsuki M. Mouse embryos culture in vitro and micro-manipulation[J]. Seitai no Kagaku, 1984, (35):90-95.

[13] Choi T, Rulong S, Resau J, et al. Mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, (93):4730-4735.

[14] Eichenlaub-Ritter U, Chandley A C, Gosden R G, et al. Alteration to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study[J]. Chromosoma, 1986, 94:337-345.

[15] Yamazaki Y, Mie T, Zhou D S, et al. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 259:64-78.

\*\*\*\*\*  
**猪价高时更要防“猪贱伤农”**  
 \*\*\*\*\*

3月25日,广东省农业厅召集我省10多家大中型养猪企业与专业户,召开生猪生产形势分析会。记者在会上获悉,尽管近期猪价依然维持在较高价位运行,但一些养殖户却对一两年后的行情感到疑虑,记者了解到,当前一些大中型养猪企业拼命卖猪苗获取眼前的利润,而不太愿意将猪养大。

**现状猪价继续保持高位运行**

据了解,受饲料原料涨价、生猪疫病以及雨雪冰冻灾害等因素的影响,春节之后,我省的生猪价格继续保持高位运行。由于高致病性猪蓝耳病等病毒病的流行,引起母猪流产,生猪特别是中、小猪发病死亡,导致部分养殖户不敢养猪,补栏积极性不高。此外,2008年初南方出现50年不遇的雨雪冰冻灾害,导致400多万头生猪死亡,仔猪死亡约占全国仔猪当月供应量的7%,这对生猪生产的恢复增添了新的难度。

据省农业厅的调查,近几个月来,受生猪价格连续持续较高位的推动,养殖户母猪、仔猪补栏积极性空前高涨。

但在昨天的会议上,一些企业却对未来养猪的风险表示出疑虑:一是,目前动物疫病越来越多,养殖的风险越来越大;二是,在价格以及国家补贴政策的推动下,各地养猪的积极性空前高涨,一年半载之后是否会重新出现“猪贱伤农”的情况的确很不好说。

**分析 太多补贴反破坏平衡关系**

“猪价低的时候才是行业需要政府扶持的时候。”出席昨天会议的养猪企业纷纷向农业厅呼吁,政府应该对保护养猪行业有一个长远的政策规划,这才是保持猪肉供销平衡的关键。目前,猪价高位运行会很自然地刺激养殖户扩大养殖规模,最终达到供销平衡,政府太多的补贴反而有可能破坏未来的平衡关系。

**呼吁 市场低迷时更应扶持**

“政府需要考虑的不是在行情好的时候补贴猪农,而是要考虑在行情不好的时候保护养猪行业。”不少养猪企业纷纷向记者表示。

他们呼吁,政府更应该在市场低迷的时候,出台扶持政策,帮助行业渡过难关,避免一些养猪企业一蹶不振,这才是保持长远供求平衡的根本。(信息来源:新华网)

\*\*\*\*\*

# 猪链球菌病灭活疫苗 (2型, HA9801株) 的研制

## —— I、猪链球菌病灭活疫苗 (2型, HA9801株) 效力检验动物模型的建立

游启有, 杨 球, 以体强, 王少英, 林旭堃, 张毓金  
(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

**摘要:** 用猪链球菌 2 型强毒 SC-6 株 (中国兽医药品监察所提供), 以较大剂量的活菌分别感染不同品种的猪, 初步测定试验猪的敏感性, 结果表明: 不同品种的猪对猪链球菌 2 型的敏感性有差异, 其中长白公猪与广东花白母猪二元杂交猪和广东省翁源地区土种猪为钝感, 其他 5 种猪均对猪链球菌敏感。选择敏感的 4 个土猪品种, 以 500 万~1000 万个活菌量感染试验猪, 结果显示: 土猪 X 最敏感, 其对试验菌敏感性、试验菌对其最小致死量都与试验猪日龄有密切关系, 1-3 月龄最敏感, 超过 6 个月龄则敏感性降低, 21-30、45-90 日龄时最小致死量 (静脉注射) 分别为 50 万个活菌、200 万个活菌。

**关键词:** 猪链球菌 2 型 SC-6 强毒株; 敏感; 最小致死量

**中图分类号:** S852.61\*1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0044-02

### 1 材料

**1.1 SC-6 菌种** 猪链球菌 2 型菌株, 中国兽医药品监察所 2005 年从四川省资阳地区急性败血症死亡猪体内分离。由中国兽医药品监察所鉴定、保存及供应。

**1.2 试验猪** 本试验所用 7 个品种的健康猪分别为: 长白公猪与本地花白母猪二元杂交猪: 由广东永顺生物制药有限公司动物场提供; 广东省翁源地区土种猪: 由广东省翁源种猪场提供; 广东省惠州地区土种猪 1、土种猪 2: 均由广东省蓝塘种猪场提供; 广东省东莞土猪: 由广东省东莞板岭种猪场提供; 广东南海土猪: 由广东省南海种猪场提供; 西藏土猪: 由广东省农科院兽医所提供。

### 2 方法

**2.1 试验用菌液的培养** 将 SC-6 株接种羊血琼脂平板 (10%绵羊全血), 37℃培养 24 小时, 挑选典型单个菌落接种肉汤培养基, 37℃培养 18 小时。分别进行革兰氏染色, 观察其形态, 并进行活菌计数。

**2.2 7 个杂交品种试验猪敏感性测定** 分别选择长白公猪与广东花白母猪二元杂交猪等 7 个品种的猪进行试验。分别采用不同数量的活菌进行静脉注射攻毒, 每组各 2~6 头猪, 稀释液为灭菌

生理盐水; 设灭菌生理盐水对照组 (4 头)。攻毒后连续观察 10 天, 记录猪的发病死亡情况。

**2.3 4 个土猪品种试验猪敏感性测定** 选择 3 月龄土猪 L、土猪 D、土猪 X、土猪 Z 进行试验。分别采用 500 万、1 000 万、5 000 万、1 亿个等 4 个不同数量的活菌进行静脉注射攻毒, 每组 5 头猪, 稀释液为灭菌生理盐水。攻毒后连续观察 10 天, 记录猪的发病死亡情况。

**2.4 最敏感土猪品种试验猪最小致死量和最适攻毒量测定** 选择土猪 X 进行实验。分别采用 21-30、45-90、165、212 日龄猪只, 以 5 万、10 万、50 万、100 万、200 万、500 万、1 000 万个等 7 个不同数量的活菌进行静脉注射, 稀释液为灭菌生理盐水。攻毒后连续观察 10 天, 记录猪的发病死亡情况。

### 3 结果

SC-6 株培养物感染试验猪后, 临床症状主要表现为: 发热, 精神萎靡, 食欲减退或废食, 皮肤潮红, 关节肿大, 跛行, 到后期多有神经症状, 呼吸困难, 呈犬坐式。发病猪一般在 72 h 内死亡, 如耐过者, 则于 7~10 天内逐渐恢复。

**3.1 7 个杂交品种试验猪敏感性的测定结果** 见表 1。初步测定试验猪的敏感性, 结果表明: 不

收稿日期: 2008-2-15

基金项目: 粤港关键领域重点突破项目 (2005A10905006)

广东省科技攻关重点项目 (2006Z2-E0071)

表 1 7个杂交品种试验猪敏感性的测定结果

品系	日龄(天)	剂量(CFU)	感染途径	结果
G	60	20亿	肌注	无症状, 2/2存活
G	60	100亿	静注, 7天后 PRRSV 肌注、滴鼻各 1mL	两猪均轻度发病, 感染 PRRSV 后病情加重, 其中一头死亡, 另一头 7 天后恢复
G	45	200亿/1头; 100亿/1头。	静注	发病, 7 天后恢复
W	70	血毒 5ml/1 头。	静注	发病, 10 天后恢复
W	80	1000万、5000万、1亿各 1 头, 6 亿 4 头	静注	1000万不发病, 5000 万以上均发病, 3 天后开始恢复
Z	120	0.5 亿/4 头; 1 亿/4 头	静注	12h 内 4/4 死亡
D	100	1000万、500 万、100 万各 4 头	静注	24~96h 内 6/6 死亡
LT	100	500万/4 头	静注	24~72h 内 2/2 死亡
L	120	100万/4 头	静注	24~72h 内 2/2 死亡
X	75	100万/5 头	静注	24~72h 内 5/5 死亡

注: 1. G: 为长白公猪与本地花白母猪二元杂交猪; W: 为广东省翁源地区土种猪; L: 广东省惠州地区土种猪 1; LT: 广东惠州地区土种猪 2; D: 广东省东莞土猪; X: 广东南海土猪; Z: 西藏土猪。2. 为了强毒稀释操作的方便性, 我们采用了正数的方法来稀释。

表 2 4个土猪品种试验猪敏感性的测定结果

品系	剂量(CFU)			
	$1.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$
土猪 L	5/5	5/5	5/5	4/5
土猪 D	5/5	5/5	5/5	4/5
土猪 X	5/5	5/5	5/5	5/5
土猪 Z	4/5	5/5	2/5	1/5

表 3 最敏感土猪品种试验猪最小致死量和最适攻毒量的测定结果

日龄	剂量(CFU)						
	5万	10万	50万	100万	200万	500万	1000万
21-30	1/5	4/5	5/5	5/5			
45-90	2/5	1/5	3/5	5/5	5/5		
165	0/5	1/5	1/5	3/5	5/5	5/5	
212	0/5	0/5	2/5	1/5	3/5	3/5	5/5

同品种的猪对猪链球菌 2 型的敏感性有差异, 其中长白公猪与广东花白母猪二元杂交猪和广东省翁源地区土种猪为钝感, 其他 5 种猪均对猪链球菌敏感。

**3.2 4 个土猪品种试验猪敏感性的测定结果** 4 个土猪品种试验猪中, 以土猪 X 最为敏感, 用 500 万个活菌静脉注射攻毒, 在 7 天内试验猪全部死亡(见表 2)。

**3.3 最敏感土猪品种试验猪最小致死量和最适攻毒量的测定结果** 土猪 X 在 21~90 日龄最为敏感。21~30 日龄猪只的最小致死量为 50 万个活菌, 45~90 日龄猪只的最小致死量为 100 万个活菌, 165 日龄猪的最小致死量为 500 万个活菌,

212 日龄猪的最小致死量为 1 000 万个活菌。这些均可使试验猪在 10 天内全部死亡。见表 3。

## 4 讨论

**4.1** 从本研究试验结果来看, 不同品种的猪对 2 型猪链球菌的敏感性是不一样的, 总的来看, 杂交品种敏感性较差, 而土种猪对 2 型猪链球菌的敏感性高一些, 而土种猪之间敏感性也有差异。同时也可以看出, PRRSV 感染对 2 型猪链球菌的致病力有一定的加强作用。

**4.2** 本研究结果为研制“猪链球菌病 2 型灭活疫苗”疫苗检验中敏感猪筛选和动物模型的建立打下了坚实的基础, 并为“猪链球菌病 2 型灭活疫苗”效力检验方法的建立提供了依据。

# 不同缝合材料与方法在犬小肠肠管吻合术中的应用效果观察

周庆国<sup>1</sup>, 李 蕾<sup>1</sup>, 林玉萍<sup>2</sup>, 张 丽<sup>2</sup>

(1. 佛山科学技术学院动物医学系, 广东 佛山 528231; 2. 佛山市先诺宠物医院, 广东 佛山 528000)

**摘要:** 为了探索不同缝合材料与方法在犬小肠肠管吻合术中的应用效果, 选择8只5-7月龄、7~8 kg体重的家犬进行小肠肠管切除及吻合术, 术后观察其精神状态与消化机能恢复情况, 并于术后2个月剖检、切片, 观察施术肠管的外部形态与肠壁组织学变化。结果显示: 双层缝合比单层缝合的肠管易发生粘连, 且肠腔内部比较狭窄; 双层缝合的黏膜不如单层缝合对合好, 且出现空隙和炎性渗出物的情况比单层缝合严重; 肠线质地比丝线硬, 缝合过程中容易拉断黏膜。结果表明, 在犬小肠肠管吻合术中, 单层缝合较传统的双层缝合效果好, 其中以选择带针非吸收性外科缝线行间断伦勃特缝合效果最好。

**关键词:** 犬; 小肠肠管吻合术; 外科丝线; 铬制肠线; 带针聚乙醇酸线

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0046-04

肠管吻合术是小动物临床治疗犬、猫多种肠道疾病的重要手术, 如肠道异物梗阻或套叠引起的肠壁坏死、创伤性肠粘连或肠套、肠壁肿瘤等, 都需要切除病变肠段并施行肠管吻合术。传统的肠管端端吻合术多采用外科丝线或肠线行双层缝合, 操作繁琐, 容易在肠管较细的幼犬中造成肠腔狭窄。虽然对较细的肠管可以行侧侧吻合, 但缝合时间过长, 肠壁浆膜层遭受更多的机械性刺激, 容易发生粘连, 不利于术后消化机能的恢复。近年来有一些采用改进方法吻合肠管的实验研究或临床应用报道, 但缺乏较系统的病理解剖学与组织学观察研究结果。为了探索不同缝合材料与方法在犬小肠肠管吻合术中的应用效果, 观察其对肠壁组织愈合及消化机能的影响, 本实验以幼龄家犬为动物实验模型, 采用不同缝合材料与方法进行肠管吻合实验, 通过术后观察动物的整体状态、消化机能、肠管形态与组织学改变, 筛选出一种或几种适合于犬小肠吻合的最佳材料与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 家犬8只, 年龄5-7个月, 体重7~8 kg, 购自本地宠物市场。将实验犬按购买顺序编为1~8号, 常规单笼饲喂商品颗粒狗粮。每天观察其精神、食欲状态, 10 d后无任何异常后即开始实验。术后5天先将颗粒狗粮用开水泡

软饲喂, 7天后转为正常饲喂。

**1.1.2 缝合材料** 1号、4号和7号外科丝线, 3/0中度铬制肠线, 3/0带针聚乙醇酸线。

**1.1.3 手术器械** 常规手术器械一套, 术前高压蒸汽灭菌后备用。

**1.1.4 实验药品** 静松灵、盐酸氯胺酮、硫酸阿托品、氨苄青霉素、庆大霉素、地塞米松、止血敏、5%葡萄糖氯化钠溶液、生理盐水、复合维生素B、维生素C、新洁尔灭、2%碘酊、75%酒精等。

**1.1.5 其他器材** 生物显微镜、切片材料、一次性注射器(1 mL、5 mL、10 mL)等。

### 1.2 方法

**1.2.1 术前准备** 实验犬术前24 h禁食, 仅喂与充足饮水。术前以0.05 mL/kg皮下注射硫酸阿托品, 5 min后以4 mg/kg肌肉注射静松灵, 使犬安静, 仰卧保定, 术部周围5 cm范围常规无菌准备。接着将2 mL(100 mg)氯胺酮加入到5%葡萄糖溶液100 mL中缓慢静脉滴注以维持麻醉。

**1.2.2 小肠肠管切除术** 选择脐部向后3 cm腹中线为手术切口, 纵向切开皮肤, 分离皮下组织, 显露腹白线并切开而入腹腔。将食指伸入腹腔勾取小肠一段出来, 用纱布隔离, 将肠内容物向两端拨开并分别用两把肠钳夹住, 展开肠系膜, 在预定切除线两侧对肠系膜血管行双重结扎, 然后沿预定切除线剪除相应的肠管和肠系膜。

**1.2.3 小肠肠管吻合术** 助手持肠钳将肠管两端靠近对齐,对1~7号犬行肠管端端吻合。在肠管肠系膜一侧和远肠系膜一侧、距肠管边缘0.5~1 cm处,分别用1号丝线做肠管全层牵引线。采用的缝合方法有螺旋缝合法、间断伦伯特缝合法、康乃尔缝合法和单层挤压缝合法,将这些缝合方法按不同组合并采用不同缝线完成各实验犬的肠管吻合术。另对8号犬行侧侧吻合术(见表1)。肠管吻合完毕用生理盐水冲洗,然后使用7号和4号外科丝线常规闭合腹壁创口。

**1.2.4 术后护理与临床观察** 实验犬术后3 d内禁食禁水,每天静脉滴注5%葡萄糖溶液250 mL,配合应用氨苄青霉素、止血敏、维生素B和维生素C等,观察记录其体温和精神状态、食欲恢复情况、创口愈合及粪便颜色。术后3 d让其自由饮水,并在饮水中加入庆大霉素4 mL(8万IU)。术后5 d开始饲喂用开水泡软的颗粒狗粮,每天2次,7天后正常饲喂。术后7~10 d根据实验犬术部愈合情况,酌情拆除皮肤缝线。

**1.2.5 剖检观察** 实验犬于术后45 d行安乐死。剖检内容为:吻合的肠管表面与其他器官有无粘连,吻合处有无明显狭窄,肠腔内狭窄情况及肠壁内凸程度。

**1.2.6 组织学观察** 取吻合处肠管组织用生理盐水冲洗,浸泡于10%福尔马林溶液中固定,石蜡定向包埋、切片、HE染色,然后置于视频生物显微

镜下观察。

## 2 结果

**2.1 实验犬术后临床表现** 术后一周内多数实验犬的体温在正常范围内波动,少数犬的体温有时偏高,但未超过39.7℃。术后第3 d除6号犬发生死亡外,其他实验犬精神、食欲恢复正常,并于术后第7天排出正常黄色条状粪便。术部未发生感染,按正常时间拆线。

**2.2 肠管吻合处剖检结果** 1号犬肠管吻合处与附近肠管有轻度粘连,被结缔组织覆盖的表面线结依稀可见,纵向切开肠腔见肠壁组织内凸约0.1 cm。2号、3号犬肠管吻合处与附近肠管粘连严重,吻合处表面有反映肠腔狭窄的明显凹痕,纵向剖开肠管见肠壁组织内凸约0.3~0.4 cm,内层丝线尚未完全脱落。4号犬肠管吻合处同样与附近肠管发生粘连,引起临近肠管的折叠性狭窄,但吻合处直径未见明显改变;纵向切开肠腔见肠壁组织内凸约0.1 cm。5号、7号、8号犬肠管吻合处表面光滑,未与周围肠管发生粘连,表面线结已被结缔组织覆盖,其中7号犬吻合处有轻微凹痕;纵向切开肠腔,见8号犬肠线已吸收,这几只犬肠壁组织内凸约0.1 cm。6号犬腹腔内有大量腹水,呈较清亮的咖啡色,肠管吻合处未发生粘连,但其前部肠管膨胀和肠壁变薄;纵向剖开肠管后发现,肠腔内有大量黑色糊状粪便,吻合处内径仅为0.5 cm(肠管外径为2 cm)。

表1 实验选用不同缝合材料与方法组合

犬号	缝合层数	缝合材料	缝合方法
1	只缝一层	1号外科丝线	间断伦伯特缝合
2	第一层	1号外科丝线	后壁螺旋缝合,前壁康乃尔缝合
	第二层	1号外科丝线	间断伦伯特缝合
3	第一层	1号外科丝线	后壁螺旋缝合,前壁康乃尔缝合
	第二层	3/0铬制肠线	间断伦伯特缝合
4	第一层	3/0铬制肠线	后壁螺旋缝合,前壁康乃尔缝合
	第二层	1号外科丝线	间断伦伯特缝合
5	只缝一层	3/0铬制肠线	单层挤压缝合
6	第一层	3/0铬制肠线	后壁螺旋缝合,前壁康乃尔缝合
	第二层	3/0铬制肠线	间断伦伯特缝合
7	只缝一层	3/0带针聚乙醇酸线	间断伦伯特缝合
8	第一层(侧侧缝合)	3/0铬制肠线	后壁螺旋缝合,前壁康乃尔缝合
	第二层	3/0带针聚乙醇酸线	间断伦伯特缝合

**2.3 肠管吻合处组织学变化** 所有实验犬肠壁黏膜层基本恢复正常,绒毛排列有序,但比正常绒毛稍短。2号、3号、4号犬黏膜下层和肌层之间有毛细血管和结缔组织增生,并有炎性细胞浸润,肌层有所增厚,且部分肌层对合不良。5号犬部分肌层也存在对合不良现象。1号、7号、8号犬肠壁结构恢复良好,黏膜层绒毛和肌层排列有序,未见结缔组织增生现象。6号犬因术后第3 d死亡,未做组织学观察。

### 3 讨论

**3.1 不同缝合方法用于犬小肠肠管吻合的效果** 肠管吻合术是指切除坏死肠管后对两断端的对接缝合手术,不同的对接缝合方法对吻合质量有着直接的影响。从实验结果看,以双层缝合方式吻合的2号、3号和4号犬肠管不仅与周围组织均发生粘连,而且因肠壁内凸造成明显狭窄。分析认为,双层缝合方式的手术时间长,肠管暴露久和遭受过多刺激,是与周围组织发生粘连的主要原因;双层缝合中的第一层全层缝合采用外科丝线后,缝合的肠壁组织不易脱落或恢复原状,这是造成肠腔狭窄的主要原因。比较2号、3号和4号犬肠腔内缝线残留及肠壁内凸情况,表明可吸收性铬制肠线适用于肠管全层缝合。因为随着肠线的逐渐消化吸收,消除了全层缝合对肠壁组织的“束缚”,使原来缝合造成的肠壁内凸程度因食糜通过而获得改善。在采用单层缝合方式的1号、5号、7号犬中,仅1号犬肠管表面发生少量粘连,而5号、7号犬肠管显示了比较满意的吻合质量。分析5号、7号犬肠管吻合无粘连、狭窄的良好效果,认为与单层缝合时间明显缩短和减少对肠壁的刺激有关,尤其7号犬采用间断伦伯特缝合,并且使用3/0带针聚乙醇酸线,对肠壁组织的损伤更为减小。根据4号犬和7号犬肠管的吻合效果,容易理解8号犬肠管的吻合质量,虽然侧侧吻合采用传统的双层缝合方式,但其肠壁内凸轻和表面不发生粘连应与选择缝线有关。再根据肠管吻合处的组织学变化,双层缝合的肠壁肌层容易出现肌纤维对合不良,而肌层增厚也是引起肠腔狭窄的一个因素。分析5号犬肠管吻合处也出现肌纤维对合不良现象,与单层挤压缝合法较复杂的进针方向有关。因此认为,犬小肠肠管吻合术宜采

用单层间断伦伯特缝合法,具有操作时间短和能较好地防止肠腔狭窄及肠壁表面粘连的优点。需要提示的是,术后45 d实验犬肠管吻合处黏膜绒毛仍未恢复到正常程度,所以术后较长时间内应当给予容易消化、富有营养的食物,以减少肠道负担,促进肠黏膜绒毛的生长。

**3.2 不同缝合材料用于犬小肠肠管吻合的表现** 不同的缝合材料均有各自的优缺点,目前还没有完全理想的缝合材料。在兽医领域,关于动物肠管缝合究竟采用何种缝线没有定论,因此本实验对兽医临床最常使用的外科丝线和铬制肠线、以及很少使用的带针聚乙醇酸线的缝合质量进行了观察。外科丝线是用蚕茧的连续性蛋白质纤维制成,属非吸收性缝线,张力强度高,操作使用方便,打结确实,且不易拉断组织,有利于提高缝合速度。术后45 d的剖检结果显示,使用丝线行肠管单层缝合肠管表面粘连少、内腔无狭窄、表面线结被薄层结缔组织覆盖的特点(如1号犬);而用丝线在肠管双层缝合中行第一层缝合,则显示出肠腔内丝线在术后45 d尚未脱落,是引起肠腔明显狭窄的重要因素(如2号、3号犬)。铬制肠线具有一定的张力强度和特定的吸收速率,有利于避免手术创形成溃疡和肠壁与腹壁发生粘连,但其缺点是异体蛋白,在吸收过程中可引起较大的组织炎症反应,尤其在感染和血管丰富的组织内张力强度丧失较快,并且因肠线没有丝线柔韧,使用中有时可拉断组织或线结容易松脱。实验结果显示,使用肠线行肠管单层缝合可以获得较好的吻合效果,肠管表面的肠线已基本吸收,肠腔无狭窄问题(如5号犬);而用肠线在双层缝合中行第一层缝合,因肠线基本被吸收,肠腔内也无肠壁内凸和狭窄问题(如4号犬)。但因肠线不够柔韧,用肠线行肠管表面缝合时若进针偏浅或拉力稍大,容易拉断浆膜,深层补针缝合的结果容易引起狭窄,尤其在对肠管行双层缝合后,术后早期肠线还未吸收时的狭窄更为明显(如6号犬)。本实验试用了价格较高的带针聚乙醇酸缝线,其为羟基乙酸的聚合物,植入体内后在脂酶作用下被逐渐水解吸收,吸收过程中炎症反应轻微,完全吸收的时间为100~120天。这种缝线具有丝线的拉力强和易打结特点,带针后又具有针身、针尾纤细和极易刺入



组织的无损伤优点, 而且缝线的水解产物还是很有有效的抗菌物质。根据 7 号、8 号犬的肠管吻合结果, 显示出使用带针聚乙醇酸线缝合不仅操作非常方便, 而且组织的严密性和肠管吻合质量得到明显提高。因此认为, 在犬小肠肠管吻合术中使用带针聚乙醇酸线是最佳选择。

#### 4 小结

不同的缝合材料与方法用于犬小肠肠管吻合术的效果具有区别, 使用带针聚乙醇酸线行单层间断伦伯特缝合容易获得良好的吻合效果, 而采用传统双层缝合方式吻合肠管, 则需使用中度铬制肠线行第一层缝合。



图 1

2 号犬肠管吻合处与周围肠管粘连, 吻合处有较深的凹陷, 显示此处狭窄。



图 2

4 号犬肠管吻合处与周围肠管粘连, 引起临近肠腔折叠性狭窄, 但吻合处直径无明显变化。



图 3

7 号犬肠管吻合处表面光滑, 凹痕较浅, 显示此处没有明显狭窄。

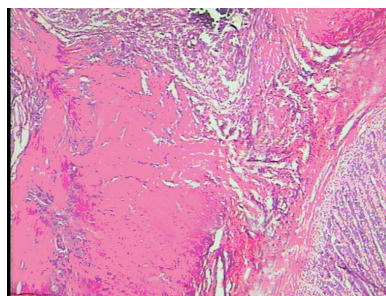


图 4

2 号犬肠管吻合处肌层有大量结缔组织增生, 组织学结构发生改变。

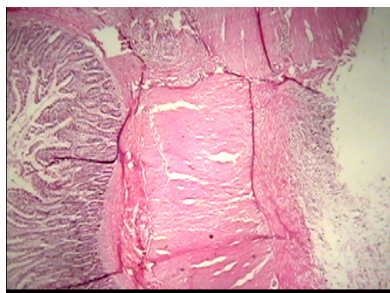


图 5

5 号犬肠管吻合处结构较好, 但肌层对合不良。

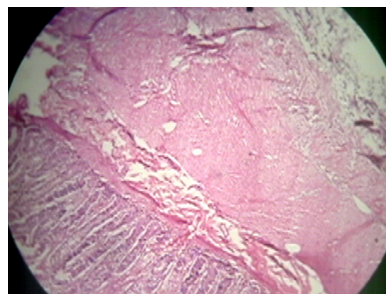


图 6

7 号犬肠管吻合处组织层次清晰, 对合良好。

# 一例犬乳房放线菌病例的诊断报告

周善英, 潘咏梅

(广州市番禺区迎宾名犬商场动物医院, 广东 广州 511442)

**摘要:** 本文报告一老龄母犬乳房放线菌病1例。该犬乳房放线菌肿较大, 有明显的病理形态学及组织学特征。于是施行手术摘除, 并对该病的相关问题进行了讨论。

**关键词:** 放线菌病; 放线菌肿; 病理学检查; 犬

**中图分类号:** S852.61\*9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2008)02-0050-02

放线菌病是由放线菌引起的一种人畜共患的慢性传染病, 以化脓性炎症和形成慢性传染性肉芽肿为特征。本病多发生于牛, 其他动物如猪、绵羊、山羊和马也可发病。2003年4月本院收治犬乳房放线菌病1例, 现将诊断结果报告如下。

## 1 临床资料

杂种狼狗, 雌性, 11岁, 毛色棕黑, 体重30 kg, 曾产仔7胎。主诉: 该犬1年前左腹下部倒数第2、3乳头之间有一肿块, 之后肿块不断增大, 病犬渐见精神萎靡、食欲下降。现症检查: 病犬稍消瘦, 自乳房基部生长一肿物, 如婴儿头大, 乳头缩短。触之感觉肿物坚实、无明显痛感。肿物位于皮下, 表面不平滑, 整体不易滑动。以粗针头穿刺肿物, 未能抽出异常物质。考虑到该肿块巨大, 使用药物治疗已经无效, 故决定以手术方法摘除肿块。切开肿物皮肤后, 见肿物表面血管丰富, 有较多疏松结缔组织包裹。充分止血后, 将肿物完整地自乳房剥离。手术过程顺利。

## 2 病理学检查

**2.1 形态学检查** 肿物呈椭球状, 大小为14.5cm×11.0cm, 重850 g, 质地硬固, 表面有若干半球状隆起(图1)。切面除有几个形态不整的小空洞外, 其余部位均为灰白色实性组织, 由无数黄豆大至小指头大的球状结节构成(图2)。结节之间以结缔组织连结, 常形成分叶状, 并见较多小血管。结节质地硬实, 切面亦呈灰白色、均质、粗糙, 部分呈放射状, 中央有一灰黄色的核心状物, 形似硫磺颗粒。多数“硫磺颗粒”质地较软, 有少数则较硬, 刀刮有磨砂感。

**2.2 组织学检查** 将肿物结节用甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 置显微镜下观察。低倍镜下可见结节内有若干菌块, 部分菌块发生钙化; 结节外缘结缔组织包围新生肉芽组织(图3)。高倍镜下可见菌块引起附近组织坏死, 坏死区外有较多吞噬菌块的中性粒细胞, 大多已发生变性、坏死甚至崩解; 尚见结缔组织间有上皮样细胞、巨噬细胞及多核巨细胞浸润, 结节边缘还见淋巴细胞及红细胞弥散分布(图4)。综合以上检查结果, 诊断本病例为放线菌肿。

## 3 讨论

**3.1 放线菌病的临床症状和病理变化比较特殊,** 依据其特征性的病理变化即镜下所见的特异性肉芽肿, 结合临床资料和肿物的眼观特征, 即可以作出诊断。临床也可取病灶内的“硫磺颗粒”压片镜检, 发现排列成放射状或菊花样的菌块后确诊。

**3.2 放线菌存在于被污染的土壤、饲料和饮水中,** 也寄生于动物口腔和消化道内。犬乳房发生放线菌病, 多因母犬哺乳时被吮乳仔犬咬伤乳头, 或由其他原因造成乳房皮肤损伤后所致。放线菌通过破损的皮肤进入体内, 引起局部组织的慢性增生性炎症过程, 出现灰白色结节, 结节周围又形成新的结节, 如此不断发展而构成大的肉芽肿, 即放线菌肿<sup>[2]</sup>。

**3.3 乳房放线菌肿与皮下纤维瘤在眼观上有相似之处,** 两者皆呈硬性肿块, 表面均有结缔组织包裹, 而且血管丰富, 容易误诊。临诊时注意从以下三个方面的区别:

**3.3.1 触摸肿胀部表面, 放线菌肿的表面多不平**



图1 福尔马林固定标本

肿块表面不平滑,被结缔组织包裹(背侧已切开)

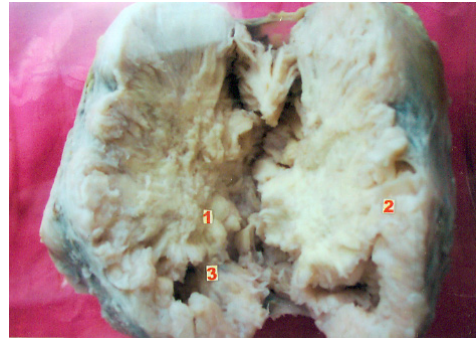


图2 肿块切面

1. 结节; 2. 分叶状结构; 3. 空洞

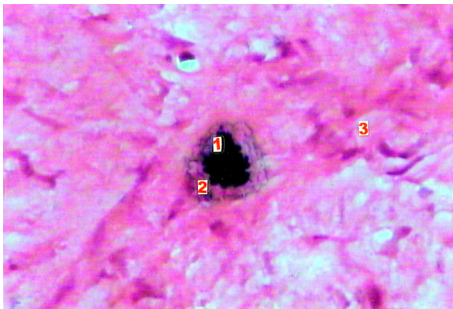


图3 肿块切片

1. 菌块; 2. 菌块周围的坏死区; 3. 肉芽组织 (HE×200)

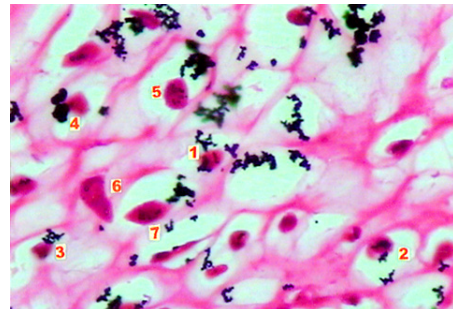


图4 肿块切片

1~4 为中性粒细胞吞噬菌块后变性、坏死和崩解; 5~7 为多核巨细胞 (HE×400)

滑,常凹凸不平或呈波浪状,皮下纤维瘤表面一般较平滑。

3.3.2 摘出肿物后观察两者切面结构,放线菌肿的切面呈若干结节或分叶状,结节中央部有淡黄色的“硫磺颗粒”,而皮下纤维瘤表面血管更丰富,切面多呈均质结构。

3.3.3 最重要的区别在于,显微镜下放线菌肿呈典

型的特异性肉芽肿结构,而皮下纤维瘤不见放线菌菌块、脓细胞及多核巨细胞,却见大量成熟程度不一的纤维组织及成纤维细胞,或见淋巴细胞和红细胞浸润等。

(致谢:佛山科学技术学院动物医学系协助制作病理组织切片!)

### 今年前两个月广东猪肉进口大增

从海关获悉,今年前2月广东省进口猪肉1.8万吨,进口值1601.7万美元,分别比去年同期大增6.8倍和6.5倍。

海关分析人士指出,今年的雪灾导致交通中断,大批生猪无法及时供应广东,由此产生的需求缺口需要通过进口猪肉来填补。不过,在进口量暴增的同时,猪肉进口价格保持平稳,平均价格为0.9美元/千克,下降3%。

据了解,今年前2月,欧盟是广东进口猪肉的主要来源地,进口量达1.4万吨,增长12倍,占进口总量的78.2%。此外自加拿大和美国分别进口猪肉1996吨和1954吨,分别增长75%和15.7倍,分别占进口总量的11%和10.8%。进口商中,私营企业为进口主力,占进口总量的69%。(信息来源:<http://www.china-ah.com/>)

# 一例犬瘟热的输血治疗体会

张煜坤<sup>1</sup>, 陈展飞<sup>2</sup>, 刘荣翕<sup>3</sup>

1. 广东省动物疫苗供应站, 广东 广州 510520; 2. 敦豪全球货运代理有限公司, 广东 佛山 528000;

3. 广州市叮嚀动物医院, 广东 广州 510520)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2008)02-0052-01

犬瘟热是犬科动物的一种急性、热性、高度接触性传染病, 是当前危害犬类最严重的烈性传染病之一。该病一年四季均可发生, 以冬春寒冷季节多发。临床上以双相热型、卡他性鼻炎、支气管炎、严重的胃肠炎、眼结膜炎、角质化病变和神经症状等为主要特征。幼犬最为易感, 纯种犬比土种犬易感性高。一旦感染, 容易引起混合感染和二次感染, 使病情加重, 死亡率达80%以上。

2007年12月初, 广州市叮嚀动物医院接诊一病犬, 根据其临床症状和犬瘟热胶体金诊断试剂盒检测, 诊断为犬瘟热。前期按常规疗法治疗效果不明显, 后期经采用犬瘟热康复犬的全血治疗, 使患犬得到治愈。现报告如下。

## 1 基本情况

小黑牧, 杂交牧羊犬, 6月龄, 体温39.5℃, 体重8.5 kg。发病3~5天, 轻微咳嗽, 鼻镜干燥, 精神萎靡, 食欲废绝, 饮少量水, 有浓眼屎, 流脓性鼻涕。应用犬瘟热胶体金快速诊断试剂盒检测, 结果为强阳性。经常规治疗2~3天, 未见好转, 患犬脚垫出现增生、角质化现象。

## 2 治疗方法

**2.1 前期治疗** 退热用安乃近, 按0.5 mL肌肉注射; 犬瘟热单克隆抗体1 mL/kg体重, 皮下注射, 每天1次, 连用5天; 0.5%葡萄糖氯化钠溶液10 mL/kg体重, 头孢曲松钠50 mg/kg体重, 利巴韦林20 mg/kg体重, 地塞米松0.5 mg/kg体重, 混合静脉滴注, 每天1次; 5%葡萄糖溶液10 mL/kg体重, 维生素C 0.5 g, 维生素B<sub>6</sub> 1 mL, 三

磷酸腺苷2 mg/kg体重, 混合静脉滴注以补充能量。连续治疗5天后, 患犬病情未见明显好转。

**2.2 输血治疗** 采用4%枸橼酸钠抗凝剂, 按1:9的比例从供血犬静脉采血18 mL, 轻轻摇匀使血液与抗凝剂充分混合。另采患犬血液2 mL, 取其血清1滴与供血犬全血1滴在玻片上进行配血试验, 见搅拌后不产生血凝块, 验证血型相配。将约20 mL抗凝血注入250 mL的5%葡萄糖水瓶内, 轻轻摇匀, 另加入2 mL地塞米松, 缓慢静脉滴注。同时, 仍给予能量和抗感染药物等。2天后, 患犬精神出现好转, 愿意站立、行走, 并进食少量平时偏爱的干酥猪肉块。5天后逐渐康复。

## 3 治疗体会

**3.1** 犬瘟热康复犬的血液中含有丰富的抗犬瘟热抗体, 在供血犬和受血犬血型相配的情况下, 可以采用犬瘟热康复犬的全血进行输血治疗。本病例在及时应用单克隆抗体和常规药物治疗后, 发现病情未有明显好转而采用了输血疗法, 结果显示了对犬瘟热的良好疗效。供血犬由患犬主人的朋友所提供, 为15月龄的牧羊犬, 曾于5月龄时感染过犬瘟热, 后经治疗而康复。

**3.2** 在本病例前期治疗中, 虽然应用单克隆抗体和有关药物未见病情明显好转, 但不能排除单克隆抗体阻止本病发展的治疗作用。后来通过输入犬瘟热康复犬的全血, 无疑对本病的治疗更加有效, 不仅给患犬提供了大量的特异性抗体, 而且补充了血容量, 增强了抵抗力, 促进其康复。