

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第42卷第6期(总第196期)

2017年12月18日出版

中国标准连续出版物号 ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

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

广东省农业科学院动物科学研究所

广东省农业科学院动物卫生研究所

主 编:蒋宗勇

责任编辑:黄琳 马新燕 吕晓慧 张洁华

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 屈源泉 廖明 曾振灵

毕英佐 徐志宏 舒鼎铭 孙彦伟

王贵平 张健骅 王致富 刘彩霞

熊惠军 吴玄光 刘清神

特邀编委:

陈峰 谢志刚 林旭堃 李岩

陈瑞爱 罗满林 向华 王华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大丰一街1号(510640)

电话:020-87576452

传真:020-87576452

网址: <http://www.gdaav.org>

E-mail: gdxmsykj@163.com

印刷单位:广州市德艺彩印有限公司

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

定价:10.00元

广告发布登记通知书编号:440000100012

本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊一次性支付作者著作权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

目前本刊已加入的数据库有:中国学术期刊(光盘版)、中文科技期刊数据库、万方数据——数字化期刊群。

目 录

·专题综述·

- 缓解奶牛热应激的营养调控研究进展 闵力,李大刚,等(1)
鸭坦布苏病毒病研究进展 汪小丽,王小庆,等(7)
浅谈魏氏梭菌对养猪生产的危害及防治措施 陈辉,肖定福(11)

·经验交流·

- 种鸡人工授精操作中存在的问题与对策 韩文格(15)
加强鸡群饮水管理的措施 郝春光(16)

·兽医临床·

- 一例犬前肢肉瘤的诊断与治疗 周红蕾,钱俞佳(19)
难产豹纹守宫的麻醉与外科治疗讨论 罗声扬,李少川(22)
双侧肾切开手术对健康犬肾功能的影响 林贤康,关钰澄,等(25)

·试验研究·

- 亚临界R134a中酶催化酯化法制取叶黄素二乙酸酯的研究 吴秀丽,李辉,等(29)
藏麻小型猪主动脉瓣关闭不全动物模型建立 龚宝勇,刘晓霖,等(37)
酵母培养物(百惠康)替代鱼粉对草鱼生长性能和抗病力的影响 李永娟,周文豪,等(40)

·简报·

- 茂名地区2016年猪伪狂犬病流行状况调查与分析 李冰,陈盛絮(44)
深圳南山家禽批发市场冬季禽流感和新城疫抗体监测 段新华,廖治锋,等(47)
动物免疫抗体监测工作中存在的问题及建议 龚伟宏(50)

·信息之窗·

- 欢迎订阅本刊 (6)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

DEC.2017 Volume 42, Number 6 (Total No.196)

Main Content

- Research advance of nutritional regulation for alleviating the effects of heat stress in dairy cows
..... Min Li, Li Dagang, et al(1)
- Research advance on the disease of duck tembusu viral Wang Xiaoli, Wang Xiaoqing, et al(7)
- Brief review on the harm of clostridium perfringens and prevention measures in swine production
..... Chen Hui, Xiao Dingfu(11)
- Problems and their countermeasures in artificial fertilization for breeder hens Han Wenge(15)
- Measures for improving drinking water management in chickens Hao Chunguang(16)
- The case of diagnosis and treatment of forelimb sarcoma in dog Zhou Honglei, Qian Yujia(19)
- Review on anesthesia and surgery treatment during dystocia of eyelid gecko Luo Shengyang, Li Shaochuan(22)
- The influence of bilateral nephrotomy on renal function in heathy dogs Lin Xiankang, Guan Yucheng, et al(25)
- The study on enzymatic esterification of lutein diacetate in subcritical R134a Wu Xiuli, Li Hui, et al(29)
- Establishment of an animal model with aortic valve insufficiency of Juema minpigs
..... Gong Baoyong, Liu Xiaolin, et al(37)
- Effect of yeast culture instead of fish meal on growth performance and anti-disease capacity in *Ctenopharynodon idellus*
..... Li Yongjuan, Zhou Wenhao, et al(40)
- Epidemiological survey and analysis of pseudorabies in Maoming area in 2016 Li Bing, Chen Shengxu(44)
- The surveillance on antibody of avian influenza and new castle disease in Nanshan poultry wholesale market in
Shenzhen Duan Xinhua, Liao Zhifeng, et al(47)
- Problems and recommendations on monitoring the antibody in animal immune Gong Weihong(50)
-

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

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

Chief Editor: Jiang Zongyong

Editor Add: No. 1 Dafeng one Street, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

Fax: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

缓解奶牛热应激的营养调控研究进展

闵力, 李大刚, 丁迪云, 童雄, 徐斌, 王刚*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室,
广东省动物育种与营养公共实验室, 广东 广州 510640)

摘要:奶牛对热应激尤为敏感, 夏天热应激给奶牛业造成了巨大的损失, 限制了行业的发展。如何有效地缓解奶牛热应激, 提高生产性能是奶牛生产者亟需解决的问题。本文对缓解奶牛热应激的营养调控研究进行综述, 系统地介绍了8类具有应用效果的营养调控技术, 为奶牛生产者提供技术参考。

关键词:奶牛; 热应激; 营养调控

中图分类号:S823.9*1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8567(2017)06-0001-06

热应激(Heat stress)是指在高温、高湿环境下, 动物产生的热负荷(内部和环境产生)超过了散热能力时, 机体所做出的非特异性生理反应的总和^[1]。当前乳业生产中使用的荷斯坦奶牛-散热性能弱、产热量大, 对热应激尤为敏感^[2]。热应激影响奶牛的健康, 导致奶牛呼吸频率增加、直肠温度升高, 干物质采食量降低、营养摄入不足, 繁殖性能下降, 产奶量降低、乳品质下降^[3]。在夏季最炎热的时候, 随着热应激程度的升高, 奶牛的死亡率呈直线上升^[4]。热应激给乳业造成了巨大的损失, 限制了奶牛养殖业的发展。如何有效地缓解奶牛热应激, 提高生产性能是奶牛生产者亟需解决的问题。当前, 为缓解奶牛热应激采取的主要措施包括营养调控、环境改善和育种途径。实际生产中, 多采用营养调控为主、辅以环境改善的综合措施。本文对缓解奶牛热应激的营养调控研究进行综述, 为奶牛生产者提供帮助。

1 脂肪和脂肪酸

热应激期间, 奶牛干物质采食量降低, 机体处于严重的能量负平衡。添加适宜的脂肪和脂肪酸能够有效地缓解热应激奶牛能量供应不足;同时

脂肪热增耗低, 可减少奶牛消化产热, 从而达到缓解热应激、提高奶牛生产性能的目的。

早期的研究结果显示:夏季补饲3%的动物油脂能够显著提高热应激奶牛的产奶量, 但会引起乳脂率显著降低。其原因可能是奶牛日粮中加入过多的中性脂肪影响了瘤胃发酵功能, 乙酸/丙酸比值降低, 影响了乳脂肪合成^[5]。因此, 有必要对脂肪进行过瘤胃保护(饱和脂肪酸、氢化鱼油、油料籽实等), 或钙化处理(脂肪酸钙)。

给夏季热应激奶牛饲喂450 g/d的过瘤胃保护棕榈酸(饱和脂肪酸)具有提高产奶量的趋势($P=0.07$), 同时显著提高乳中真蛋白含量^[6]。Wang等^[7]通过给热应激奶牛饲喂1.5%和3%的饱和脂肪酸, 缓解了热应激奶牛能量供应不足的问题, 同时避免了饲喂不饱和脂肪酸可能引起的瘤胃功能紊乱的问题。结果显示:饱和脂肪酸的添加能够提高产奶量、乳脂肪含量、乳中总固形物含量, 并降低了14:00 h的直肠温度, 提高了热应激奶牛的生产性能。鱼油中富含大量的 ω -3系多不饱和脂肪酸, 氢化鱼油是通过加氢使鱼油不饱和脂肪酸变为饱和脂肪酸。通过给夏季放牧的奶牛补饲0.2 kg/d的氢化鱼油能够显著提高产奶量、乳脂肪

收稿日期:2017-09-29

基金项目:广东省省属科研机构改革创新领域项目(2014B070706014)

作者简介:闵力(1988-), 男, 江西九江人, 博士, 助理研究员, 从事草食动物营养研究. E-mail:min1988317@163.com

*通讯作者:王刚(1968-), 男, 湖北人, 高级兽医师, 从事草食动物营养与繁育研究. E-mail:wgw92004@yahoo.com.cn

含量和乳蛋白含量,提高热应激奶牛的生产性能^[8]。油料籽实是很好的脂肪补充料,由于其种皮的保护作用,能够降低其在瘤胃中释放速度,有效提高日粮能量浓度。Caroprese等^[9]使用亚麻籽替代全混合日粮中6.5%的精料饲喂热应激奶牛,结果显示:饲喂亚麻籽能够显著提高血浆中免疫球蛋白G的浓度,降低免疫抑制因子白介素-10的浓度,从而提高热应激奶牛的免疫能力。近期的研究表明:热应激导致奶牛补体系统显著下调,机体产生免疫损伤^[10]。由此可见,油料籽实不仅能够缓解能量供应不足,还能提高热应激奶牛的免疫能力。Moallem等^[11]给热应激奶牛补饲1.5%的脂肪酸钙,结果显示:脂肪酸钙对产奶量无显著性影响,但极显著地提高了乳脂肪含量、产奶量/干物质采食量的转化效率;同时有效地降低了代谢产热,能够达到提高乳品质和生产效率的作用。另一项研究显示:给夏季的泌乳奶牛补饲2.54%的脂肪酸钙能够显著提高4%矫正乳产量(FCM)和乳脂肪含量^[12]。

2 日粮纤维比例

热应激期间,奶牛首先降低粗饲料的采食量,粗纤维在体内的消化和代谢会产生更多的热量,奶牛减少粗纤维的摄入量是一种抵抗热应激的本能反应。因此,有必要将日粮中结构性纤维含量降到最低,保证日粮中可消化性纤维含量高的中性洗涤纤维在25~28%为宜(干物质基础)。通过饲喂优质粗饲料,如:鲜嫩多汁的青草及瓜类、果皮等,增加饲料适口性,从而增加热应激奶牛的采食量,增加有效纤维的摄入量。Kanjapruhipong等^[13]在热应激期间,减少奶牛日粮中的青贮干草、增加木薯的比例,从而调整日粮中纤维含量。当日粮中中性洗涤纤维含量为28.9%时,干物质采食量和净能摄入量极显著高于中性洗涤纤维含量在32.1%以上的高纤维日粮处理组;产奶量和4%矫正乳产量(FCM)显著高于高纤维日粮处理组。另一项研究表明:通过将日粮中16.5%大豆皮替代青贮玉米,能够提高饲料的消化率,有效地增加热应激奶牛的采食时间,延长饲料在消化道中的停留时间,减少了采食次数;并显著提高了产奶量和乳脂肪含量^[14]。

3 酵母和饲用微生物

饲用酵母是经酵母菌发酵制成的一种蛋白质饲料。它的蛋白质含量较高,易吸收,且含有丰富的维生素、氨基酸、寡糖、小分子肽、醇类及其他一些重要的辅助因子,是目前比较理想的廉价优质蛋白质饲料。奶牛日粮中添加适量的酵母,能调整菌群结构、改变瘤胃发酵方式,增加采食量,提高微生物蛋白产量、饲料消化率,从而达到提高生产性能的作用。夏季热应激期间,给泌乳中期的奶牛饲喂60 g/d的酵母培养物,能够显著提高饲料转化效率;与对照组相比,能量矫正乳/干物质采食量比值提升7%^[15]。为了进一步确认饲用酵母在缓解奶牛热应激方面的应用效果,Bruno等^[16]选取了723头荷斯坦奶牛开展了大规模牧场试验。结果显示:饲喂30 g/d的酵母培养物能够改善热应激奶牛的产奶量和乳成分(乳脂率、乳蛋白含量和乳糖含量),产奶量提高了1.2 kg ($P=0.02$)。一项最新的研究显示:给奶牛饲喂酵母培养物(25×10^{10} CFU活酵母和 5×10^{10} CFU酵母代谢物)能够显著提高热应激奶牛产奶量、4%矫正乳产量(FCM)、能量矫正乳产量、乳糖含量和乳中总固形物含量;同时能够显著降低热应激奶牛的呼吸频率,达到缓解奶牛热应激的效果^[17]。Moallem等^[18]给热应激奶牛饲喂6 g/d活酵母(浓度为 10^{10} CFU/g)能够极显著提高奶牛的干物质采食量、产奶量和4%矫正乳产量(FCM),显著提高饲料转化效率以及乳糖含量。然而,另一项研究表明:给热应激奶牛饲喂4 g/d活酵母(浓度为 15×10^9 CFU/g)对采食量和产奶量无显著影响,仅提高了乳脂率和瘤胃的中性洗涤纤维消化率^[19]。由此可见,饲用酵母的产品质量决定了其在热应激奶牛中的应用效果。

Boyd等^[20]评估了饲用微生物对夏季热应激奶牛生产性能和表观消化率的影响。饲喂 4×10^9 CFU的嗜乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)和费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)活菌混合物能够极显著提高产奶量和乳蛋白含量,显著提高能量矫正乳产量以及粗蛋白和中性洗涤纤维的表观消化率,提高了热应激奶牛的生产性能。

4 矿物质

矿物质对维持动物正常的生理、生化功能的作用

用极其重要。热应激时, 奶牛干物质采食量降低, 某些矿物质随着体液大量排出。日粮中添加矿物质能够提高热应激期间的产奶量, 减轻热应激症状。

研究表明, 热应激奶牛饲喂 4 g/d 的酵母螯合铬能够极显著提高奶牛的干物质采食量和产奶量, 对乳成分无显著影响^[21]。另一项研究评估了日粮中添加铬对产前 3 周至产后 12 周的热应激奶牛生产性能和繁殖性能的影响。结果显示: 给奶牛饲喂 6 mg/d 的有机铬, 能够显著提高产后 5~12 周的干物质采食量, 产后 0~12 周的产奶量, 对乳成分无显著影响; 同时能够有效地提高奶牛的妊娠率, 提高了热应激奶牛的繁殖性能^[22]。添加硒和含硒酵母能够缓解热应激对奶牛氧化还原平衡和代谢的影响, 提高免疫功能、乳品质和奶牛健康^[23]。日粮中添加硒能够显著提高热应激奶牛血液中的谷胱甘肽过氧化物酶活性, 提高奶牛机体的抗过氧化能力^[24]。Oltamari 等^[25]评估了不同硒源对热应激奶牛产奶量、乳成分和生理指标的影响。结果显示: 不同硒源对产奶量无显著影响, 饲喂有机酵母硒能够显著提高乳脂率、降低牛奶中的体细胞数, 更有利于奶牛的乳房健康。日粮中添加硒缓解奶牛热应激的机理可能是: 硒的添加能够显著提高血浆中硒蛋白 P 的含量, 从而缓解热应激引起的硒蛋白 P 缺乏^[10]。

5 维生素

维生素主要是以辅酶和催化剂的形式广泛参与机体的多种代谢, 从而保证机体组织器官具有正常功能。补充维生素在奶牛的抗应激过程中起重要作用。

早期研究表明热应激可导致动物肝脏中维生素 A 含量下降, 添加高于正常需要量的维生素 A 很有必要。给热应激奶牛饲喂 100 000 IU/d 的维生素 A 能够显著提高机体中性粒细胞吞噬能力、降低乳中体细胞数, 提高机体免疫力; 同时减少了发情奶牛配种的次数, 提高了繁殖能力^[26]。一项体外细胞试验显示: 热应激导致奶牛的胚胎和囊胚期发育受阻, 添加维生素 A 能够有效地缓解热应激对奶牛卵母细胞发育的不良影响, 改善繁殖性能^[27]。

夏季奶牛体内维生素 C 合成能力下降, 热应

激导致奶牛血浆中的维生素 C 浓度显著降低^[28]。维生素 C 可以保证皮质激素的稳定分泌, 为散热提供足够的能量; 同时, 能够直接参与细胞和机体免疫应答, 增加机体免疫机能, 提高抗应激能力, 并有效清除应激条件下产生的大量活性自由基, 缓解热应激引起的抗氧化酶活性的降低, 保护生物膜免受损害。在日粮中补充维生素 C 可显著抑制奶牛体温上升, 提高采食量, 降低血液中皮质醇浓度, 增加骨中钙的活性, 提高抗病力的作用。

烟酸也称作维生素 B₃, 是一种较好的抗应激因子, 可提高夏季热应激奶牛的产奶性能和繁殖性能。热应激奶牛饲喂 12 g/d 的过瘤胃烟酸能够有效地增加蒸发散热量, 增加奶牛的饮水量^[29]; 显著降低奶牛的直肠和阴道温度^[30, 31]; 同时, 能够显著降低乳体细胞评分, 有缓解产后能量负平衡的趋势^[32]。另有研究表明给热应激奶牛饲喂 19 g/d 的过瘤胃烟酸能够显著降低奶牛在 09:00 h 的呼吸频率, 极显著降低奶牛在 04:30、09:00 和 20:30 h 的喘息评分^[33]。然而, 多项研究结果表明: 饲喂烟酸有可能导致奶牛的乳脂率降低, 使用时应注意饲喂的适宜剂量。

6 离子缓冲剂

奶牛热应激时, 呼吸频率加快, 导致呼吸性碱中毒和代谢性酸中毒, 使奶牛在热应激时期增加了对 Na⁺ 和 K⁺ 的需要量。Na⁺ 和 K⁺ 是维持体内酸碱平衡的重要阳离子, 提高其在日粮中的浓度对奶牛抗热应激、增加干物质采食量和维持产奶量有明显效果。在严重热应激的情况下, 添加 2.2% 的 NaCl (干物质基础) 能够显著提高 4% 矫正乳产量 (FCM)、乳蛋白含量和乳脂肪含量, 产奶量提高了 8.64%^[34]。

阴阳离子 (DCAB) 平衡直接影响体内的酸碱平衡、离子平衡及酶系统等。调节 DCAB 可以调节机体的多种机能, 使之有利于热应激奶牛产奶性能的发挥。DCAB 对热应激奶牛采食量、消化率、矿物质代谢、酸碱平衡及其他血液生化指标、产奶性能等有不同程度的影响。在饲喂低蛋白日粮的情况下, 夏季饲喂 50 mEq/100 g 干物质的 DCAB 能够显著提高乳脂率, 奶牛血液中的总氨基酸和必需

氨基酸浓度显著升高, 蛋白质利用率提高^[35]。夏季饲喂 DCAB 能够显著降低血浆尿素氮浓度, 提高热应激奶牛蛋白质利用率, 改善机体 N 代谢^[36]。

7 植物提取物

近些年来, 植物提取物在畜牧业中被广泛应用。中草药作为一类我国传统的植物提取物, 兼有药物和营养物质的双重作用; 在饲料中添加, 可以清热解暑、凉血解毒和增强机体免疫机能, 无残留、无污染, 因此在研究和生产中受到人们的广泛关注。柴胡作为传统的中草药, 具有发汗、解热和免疫调节的作用^[37], 常作为缓解热应激的药物和添加剂被使用。Pan 等^[38]通过给热应激奶牛饲喂 0、0.25、0.5、1.0 g/kg 干物质的柴胡提取物, 从而评估柴胡作为缓解热应激添加剂的应用效果。结果显示: 饲喂柴胡提取物能够显著地降低呼吸频率 (71.4, 65.6, 60.3, 67.4 次/min) 和直肠温度 (39.3, 39.1, 39.0, 39.1 °C), 提高干物质采食量 (20.9, 22.8, 21.6, 22.1 kg/d) 和产奶量 (31.6, 34.2, 33.4, 32.4 kg/d), 添加 0.25 g/kg 的柴胡提取物就能够达到缓解奶牛热应激, 提高生产性能的目的。陈皮为芸香科植物橘及其栽培变种的成熟果皮, 将陈皮应用于饲料中, 具有促进消化、提高免疫力、降血脂、抗氧化和抗菌等多种功效, 可显著提高动物的生产性能。研究表明: 给热应激奶牛饲喂 4 g/d 的陈皮提取物能够极显著增加奶牛的卧床时间, 提高奶牛的舒适度, 达到缓解热应激的效果; 同时, 能够显著降低乳中体细胞数, 改善奶牛的乳腺健康, 有助于防治奶牛乳房炎^[39]。

甜菜碱是一种生物碱, 作为饲料添加剂具有提供甲基供体功能, 可节省部分蛋氨酸。具有调节体内渗透压, 缓和应激的作用。给热应激奶牛饲喂 15 g/d 的甜菜碱能够显著干物质采食量、产奶量、乳蛋白率、乳糖率, 显著提高奶牛血浆中应激激素-皮质醇浓度, 谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性, 使体内活性氧和自由基的减少, 抗氧化力得到提高^[40]。

8 其他抗热应激添加剂

莫能菌素又称瘤胃素, 属聚醚类抗生素, 是由链霉菌发酵所产生的一种离子载体, 是一种反

刍动物中运用较广泛的饲料添加剂, 具有控制瘤胃中挥发性脂肪酸比例, 减少瘤胃中蛋白质的降解, 降低饲料干物质消耗, 改善营养物质利用率和提高动物能量利用率等作用。给热应激奶牛饲喂 450 mg/d 的莫能菌素能够显著降低干物质消耗, 对产奶量无显著影响, 饲料转化效率提高了 7%; 但莫能菌素会导致奶牛的直肠温度和呼吸频率升高, 乳脂率和乳蛋白率降低^[41]。莫能菌素在缓解奶牛热应激上的应用有待于进一步的研究。

γ -氨基丁酸(GABA)是一种功能性的非蛋白氨基酸, 能够作为哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经传达物质^[42]。研究报道指出: GABA 具有调节体温的作用, 注射 GABA 能够降低高温环境下的体表温度^[43]。为了研究 GABA 对热应激奶牛的调控作用, 在炎热的夏季, 选择 60 头荷斯坦奶牛, 分别饲喂 0、40、80、120 mg GABA。结果发现, 在奶牛日粮中添加过瘤胃保护性 GABA 能够降低直肠温度, 有效缓解奶牛热应激, 提高干物质采食量、乳产量和改善乳品质; GABA 在热应激奶牛日粮中的适宜添加量为每千克干物质 40 mg。研究成果为 GABA 在热应激奶牛生产中的应用提供了技术依据^[44]。

参考文献:

- [1] Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard L H, et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants [J]. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 2010, 4(7): 1167-1183.
- [2] Bernabucci U, Biffani S, Buggiotti L, et al. The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97: 471-486.
- [3] Atrian P, Shahryar H A, Heat Stress in Dairy Cows (A Review) [J]. *Research in Zoology*, 2012, 2: 31-37.
- [4] Vitali A, Segnalini M, Bertocchi L, et al. Seasonal pattern of mortality and relationships between mortality and temperature-humidity index in dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92: 3781-3790.
- [5] Drackley J, Cicela T, LaCount D. Responses of primiparous and multiparous Holstein cows to additional energy from fat or concentrate during summer [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86: 1306-1314.
- [6] Wartjes J L, Robinson P, Galo E, et al. Effects of feeding supplemental palmitic acid (C16: 0) on performance and milk fatty acid profile of lactating dairy cows under summer heat [J].

- Animal Feed Science Technology, 2008, 140:241-257.
- [7] Wang J P, Bu D P, Wang J Q, et al. Effect of saturated fatty acid supplementation on production and metabolism indices in heat-stressed mid-lactation dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93:4121-4127.
- [8] Gallardo M, Valtorta S, Leva P, et al. Hydrogenated fish fat for grazing dairy cows in summer [J]. International Journal of Biometeorology, 2001, 45:111-114.
- [9] Caroprese M, Marzano A, Entrican G, et al. Immune response of cows fed polyunsaturated fatty acids under high ambient temperatures [J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92: 2796-2803.
- [10] Min L, Cheng J, Zhao S, et al. Plasma-based proteomics reveals immune response, complement and coagulation cascades pathway shifts in heat-stressed lactating dairy cows [J]. Journal of Proteomics, 2016, 146:99-108.
- [11] Moallem U, Altmark G, Lehrer H, et al. Performance of high-yielding dairy cows supplemented with fat or concentrate under hot and humid climates [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93: 3192-3202.
- [12] Serbester U, Gorgulu M, Kutlu H, et al. The effects of sprinkler+ fan, fish meal or dietary fat on milk yield and milk composition of dairy cows in mid lactation during summer [J]. Journal of Animal and Feed Sciences, 2005, 14:639.
- [13] Kanjanapruthipong J, Homwong N, Buatong N. Effects of prepartum roughage neutral detergent fiber levels on periparturient dry matter intake, metabolism, and lactation in heat-stressed dairy cows [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93: 2589-2597.
- [14] Halachmi I, Maltz E, Livshin N, et al. Effects of replacing roughage with soy hulls on feeding behavior and milk production of dairy cows under hot weather conditions [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87:2230-2238.
- [15] Schingoethe D, Linke K, Kalscheur K, et al. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87:4178-4181.
- [16] Bruno R G, Rutigliano H M, Cerri R, et al. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress [J]. Animal Feed Science and Technology, 2009, 150: 175-186.
- [17] G. Salvati, N.M. Júnior, A. Melo, R. Vilela, F. Cardoso, M. Aronovich, R. Pereira, M. Pereira, Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98:4062-4073.
- [18] Moallem U, Lehrer H, Livshitz L, et al. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility [J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92:343-351.
- [19] Dehghan-Banadaky M, Ebrahimi M, Motameny R, et al. Effects of live yeast supplementation on mid-lactation dairy cows performances, milk composition, rumen digestion and plasma metabolites during hot season [J]. Journal of applied animal research, 2013, 41:137-142.
- [20] Boyd J, West J, Bernard J. Effects of the addition of direct-fed microbials and glycerol to the diet of lactating dairy cows on milk yield and apparent efficiency of yield [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94:4616-4622.
- [21] Al-Saiady M, Al-Shaikh M, Al-Mufarrej S, et al. Effect of chelated chromium supplementation on lactation performance and blood parameters of Holstein cows under heat stress. Animal Feed Science and Technology, 2004, 117:223-233.
- [22] Soltan M, Effect of dietary chromium supplementation on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress [J]. Journal of animal physiology and animal nutrition, 2010, 94: 264-272.
- [23] Sejian V, Valtorta S, Gallardo M, et al. Ameliorative measures to counteract environmental stresses [J]. Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production, Springer, 2012, pp. 153-180.
- [24] Calamari L, Petretera F, Abeni F, et al. Metabolic and hematological profiles in heat stressed lactating dairy cows fed diets supplemented with different selenium sources and doses [J]. Livestock Science, 2011, 142:128-137.
- [25] Oltramari C E, PinheiroMdG, De Miranda M S, et al. Selenium sources in the diet of dairy cows and their effects on milk production and quality, on udder health and on physiological indicators of heat stress [J]. Italian Journal of Animal Science, 2014, 13:2921.
- [26] De K, Pal S, Prasad S, et al. Effect of micronutrient supplementation on the immune function of crossbred dairy cows under semi-arid tropical environment [J]. Tropical Animal Health and Production, 2014, 46:203-211.
- [27] Lawrence J, Payton R, Godkin J, et al. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation [J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87:2449-2454.
- [28] Padilla L, Matsui T, Kamiya Y, et al. Heat stress decreases plasma vitamin C concentration in lactating cows [J]. Livestock Science, 2006, 101:300-304.
- [29] Rungruang S, Collier J, Rhoads R, et al. A dose-response evaluation of rumen-protected niacin in thermoneutral or heat-stressed lactating Holstein cows [J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97:5023-5034.
- [30] Zimbelman R, Baumgard L, Collier R. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93:2387-2394.
- [31] Zimbelman R, Collier R, Bilby T. Effects of utilizing rumen

protected niacin on core body temperature as well as milk production and composition in lactating dairy cows during heat stress[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2013, 180:26-33.

[32] Yuan K, Shaver R, Bertics S, et al. Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95:2673-2679.

[33] Wrinkle S, Robinson P, Garrett J. Niacin delivery to the intestinal absorptive site impacts heat stress and productivity responses of high producing dairy cows during hot conditions [J]. *Animal Feed Science and Technology*. 2012, 175:33-47.

[34] Granzin B, Gaughan J. The effect of sodium chloride supplementation on the milk production of grazing Holstein Friesian cows during summer and autumn in a humid sub-tropical environment. *Animal Feed Science and Technology*, 2002, 96:147-160.

[35] Wildman C, West J, Bernard J. Effect of dietary cation-anion difference and dietary crude protein on performance of lactating dairy cows during hot weather [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90:1842-1850.

[36] Wildman C, West J, Bernard J. Effects of dietary cation-anion difference and potassium to sodium ratio on lactating dairy cows in hot weather [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90:970-977.

[37] Ashour M L, Wink M. Genus Bupleurum: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 63:305-321.

[38] Pan L, Bu D, Wang J, et al. Effects of Radix Bupleuri extract supplementation on lactation performance and rumen fermentation in heat - stressed lactating Holstein cows [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2014, 187: 1-8.

[39] Havlin J, Robinson P. Intake, milk production and heat stress of dairy cows fed a citrus extract during summer heat [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 208:23-32.

[40] Zhang L, Ying S, An W, et al. Effects of dietary betaine supplementation subjected to heat stress on milk performances and physiology indices in dairy cow [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13:7577-7586.

[41] Baumgard L, Wheelock J, Sanders S, et al. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94:5620-5633.

[42] Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs [J]. *International Review of Cytology*, 2002, 213:1-47.

[43] Miyazawa T, Kawabata T, Okazaki K, et al. Oral administration of γ -aminobutyric acid affects heat production in a hot environment in resting humans [J]. *Journal of Physiological Anthropology*, 2012, 31:1.

[44] Cheng J, Bu D, Wang J, et al. Effects of rumen-protected γ -aminobutyric acid on performance and nutrient digestibility in heat-stressed dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97:5599-5607.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

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、广东省农业科学院动物科学研究所、广东省农业科学院动物卫生研究所

定 价: 每期定价 10.00 元, 全年 60.00 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: 广州市天河区五山大丰一街 1 号 103 室《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编: 510640)

电 话: 020-87576452

传 真: 020-87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

鸭坦布苏病毒病研究进展

汪小丽¹, 王小庆², 蔡丝丝², 郭霄峰^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 广州格雷特生物科技有限公司, 广东 广州 510730)

摘要:自2010年我国首次暴发鸭坦布苏病毒病以来, 目前已给我国养鸭业造成了很大的损失, 已成为我国主要鸭病之一。本文从该病毒的流行病学及实验室诊断方法两个方面对鸭坦布苏病毒病进行综述。

关键词:鸭坦布苏病毒; 流行病学; 诊断技术

中图分类号:S852.65+7 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2017)06-0007-04

浙江养鸭密集的地区在2010年春季最先暴发了鸭坦布苏病毒病, 该病是以鸭产蛋率下降、神经症状、出血性卵巢炎为主要特征的一种急性、烈性传染病^[1-2]。鸭坦布苏病毒病的特点是发病急、传播快^[3]。此病的暴发给我国的养鸭业造成了巨大的经济损失。病鸭的症状伴有高热、食欲减退, 产蛋量急剧下降, 甚至停产, 发病率达100%, 死亡率约5~15%^[4-5]。鸭坦布苏病毒病也被称为鸭出血性卵巢炎、鸭产蛋下降综合征^[6]。该病可以通过临床症状、病理变化和流行病学进行初步诊断, 经过实验室技术诊断确诊。本文对鸭坦布苏病毒病诊断方法的研究进展进行综述, 为该病毒的早期、快速、准确诊断提供参考依据。

1 流行病学

2010年鸭坦布苏病毒病在浙江暴发后, 其传播迅速, 随后蔓延至十多个沿海省市, 如广东、广西、福建、江西、上海等主要鸭养殖地区。鸭坦布苏病毒病对鸭的易感性在不同品种之间存在差异, 其中以麻鸭为最易感, 其次是樱桃谷种鸭, 研究发现肉鸭和鹅也能感染。有学者在鸡蛋中分离到了鸡坦布苏病毒^[7], 林建等研究表明坦布苏病毒

对鸡的易感性和致病性都比较低^[8]。黄病毒属的病毒的传播途径主要通过节肢动物传播, 其中30种由蚊子传播, 11种由蝉传播^[9]。该病在一年四季都可以发生, 但主要集中在秋冬季。法国病毒学家Emest Gould研究指出蚊子不是该病毒传播的唯一媒介。于春梅^[10]等利用RT-PCR方法对发病区的60份麻雀样品进行检测, 检出率高达63.3%, 表明鸟类也是该病重要的传播媒介。研究发现DTMUV还可经水平传播^[11], 传播媒介有粪便排出, 污染环境、饲料、饮水、器具等。应通过重视鸭舍地面的清理和消毒等来控制DTMUV的感染和传播。另有研究发现从病鸭卵巢、种蛋、鸭胚中检测出病毒, 因此表明鸭坦布苏病毒也可通过垂直传播^[12]。

2 诊断

当前对于该病的诊断主要通过临床症状进行初步诊断, 然后再经过实验室诊断进行确诊。目前实验室对鸭坦布苏病毒主要的诊断方法有病毒分离鉴定、血清学检测方法以及分子生物学诊断技术等。

2.1 临床诊断

收稿日期:2017-09-13

基金项目:广州市产学研协同创新重大专项(201504281643265)

作者简介:汪小丽(1990-), 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学与微生物学方向的研究. E-mail:1528299384@qq.com

*通讯作者:郭霄峰, xfguo@scau.edu.cn

鸭坦布苏病毒感染后的典型症状是产蛋量骤降。可见发病鸭精神沉郁、采食和饮水较少甚至废绝、体温升高、不愿站立、驱赶不动, 部分病鸭甚至会出现脚软、歪脖、呈观星状、翅膀麻痹和共济失调等严重的神经症状。剖检病变主要为肝脏出血, 脾脏、肾脏肿大, 产蛋鸭的病变主要有卵泡变形和破裂, 或卵泡膜明显增厚以及出血等。根据上述症状和病变可初步判定为DTMUV感染。

2.2 病毒分离鉴定

DTMUV进行诊断鉴定时, 通常从病鸭病变组织(如卵巢、卵泡膜、肝脏、脾脏等)中分离得到病毒, 将其在鸡胚、鸭胚、鸭胚成纤维细胞中进行增殖。在卵巢和出血卵泡膜中病毒分离率最高, 常用病毒分离方法是先将发病组织进行匀浆, 再3次冻融后除菌过滤, 无菌接种于9~10日龄SPF鸡胚尿囊腔或10~12日龄鸭胚尿囊腔, 接种3~6天后收集死胚的尿囊液, 并将尿囊液接种于鸡胚或鸭胚成纤维细胞上, 培养获得分离毒株。通过电镜、RT-PCR、血清中和试验、免疫组化等技术可以对鸭坦布苏病毒病进行鉴别。万春和等^[13]、李玉峰等^[14]从种蛋鸭的多种病变组织中分离到多株DTMUV, 例如卵巢、脾脏、卵泡膜、脑膜、脑组织等。陈仕龙等^[15]也从发病鸡的一些病变组织中分离到3株DTMUV。

2.3 分子生物学诊断

2.3.1 环介导等温扩增(LAMP)技术

环介导等温扩增(LAMP)是一种新型恒温核酸扩增技术, 具有操作简便、反应迅速、特异性强、灵敏度高等特点, 且不需要PCR仪等仪器。适合应用于养殖场和基层部门。大量的研究表明RT-LAMP方法检测的灵敏度高, 是常规RT-PCR方法的100倍, 但重复率较RT-PCR方法低。欧全宾等^[16]运用RT-LAMP方法检测山东82份疑似鸭坦布苏病毒病料, 检出率达到87.8%; Yan等^[17]运用RT-LAMP和RT-PCR方法对96份样品进行检测, 检测符合率高达96.9%。由此可知RT-LAMP方法操作简便, 灵敏度高, 检测时间短, 为基层兽医站和养殖场检测DTMUV提供了有效、快速的方法。

2.3.2 RT-PCR

RT-PCR技术是先以病毒的RNA链为模板进行反转录, 再以PCR进行核酸扩增来检测病毒的一种简便、迅速、灵敏的方法, 广泛应用于动物疾病的诊断。王林川等^[18]建立了对病死鸭肝脾组织直接进行特异性RT-PCR快速检测DTMUV的方法; 赵宏等^[19]建立了能同时快速检测DTMUV和所有亚型AIV以及H9亚型AIV分型病毒的多重PCR检测的方法; 万春和等^[20]建立了检测鸭黄病毒的RT-PCR方法; 孙敏华等^[21]建立能同时检测鸭黄病毒和减蛋综合症病毒的二重PCR检测方法, 且该方法中不与其他病毒(鸭肝炎病毒、鸭瘟病毒、小鹅瘟病毒、番鸭细小病毒等)发生交叉反应; 张艳芳等^[22]还建立了DTMUV和鸭圆环病毒的二重RT-PCR方法。上述方法均能简便快速的检测出DTMUV。

2.3.3 荧光定量RT-PCR

荧光定量PCR技术结合了常规PCR技术和光谱技术, 具有定量准确、灵敏度高、特异性强和速度快的特点, 是目前运用于动物疫病检测技术中的一种定量检测技术。王楠楠等^[23]建立了检测坦布苏病毒的SYBRGreen I绝对荧光定量RT-PCR方法, 该方法的检测敏感性可达到20 copies。Yan等^[24]建立鸭坦布苏病毒TaqMan探针荧光定量RT-PCR方法, 灵敏度是RT-PCR的100倍, 且最低能检测到50 copies的病毒核酸。靳宇田等^[25]建立了荧光定量RT-PCR方法, 用该方法检测源于江苏省和安徽省29份疑似病料, 阴性检出率达到93.1%。曾婷婷等^[26]建立了一种对坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒进行鉴别的二重实时荧光定量RT-PCR方法, 研究表明此方法针对性强, 只对鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒的目的片段进行扩增, 且2种病毒无交叉扩增反应。张艳芳等^[27]通过研究建立了可同时检测出DTMUV和DPV的二重荧光定量RT-PCR的方法, 且研究表明此方法对DTMUV和DPV的检测灵敏度高, 可达100 copies。综上所述, 荧光定量RT-PCR技术因其灵敏度高, 特异性好, 稳定性强的特点, 可用于DTMUV早期感染的快速诊断和流行病学调查。

2.3.4 套式PCR方法

套式PCR方法也被称为巢式PCR法,先利用两对PCR引物扩增完整的DNA片段,再用第一对引物扩增所得到的产物作为模板进行第二轮扩增反应的技术。此检测技术较其它方法特异性好,敏感性高。例如黄欣梅等^[28]建立了一种可最低检测到101.89 TCID₅₀/0.1 ml的禽黄病毒的套式RT-PCR检测方法,此检测方法的敏感性较普通PCR方法高1000倍;张琳等^[29]研究创建了鸭黄病毒的巢式PCR反应体系,该体系只特异性扩增鸭黄病毒目的基因,并未对其他病毒基因进行扩增,其检测灵敏度达到90 copies/ μ l,是普通PCR的1000倍。颜丕熙等^[30]建立鸭坦布苏病毒检测的套式RT-PCR方法,并且该方法的敏感度比一般PCR高10倍。一系列研究表明套式PCR方法为鸭坦布苏病毒病的诊断和流行病学研究调查提供了一种行之有效检测方法。

2.3.5 核酸探针

核酸探针技术是一种常用的分子生物学诊断技术,操作简单方便,不受抗体抗原反应限制,结果判定简单,此方法也适用于基层兽医站和养殖场对DTMUV的检测。高绪慧等^[31]研究表明,地高辛标记探针能够很好检测出DTMUV的RNA,其最低检出限量为100 μ g/l,且特异性良好,研究表明检出率最高的组织是卵泡膜。

2.4 血清学方法

2.4.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

ELISA、琼脂扩散试验(AGP)、血凝抑制试验(HI)、中和试验(NT)是常用于检测黄病毒属的血清学检测方法。其中最常用的是ELISA,ELISA检测方法,其针对性强、灵敏度高、检测速度快,常用于大批样品的血清检测。坦布苏病毒的主要结构蛋白是E蛋白,以该蛋白作为抗原建立一种检测DTMUV的ELISA方法。钮敏慧等^[32]以鹅源坦布苏病毒JS804株E蛋白作为包被抗原建立了间接ELISA检测方法。郝明飞^[33]等在研究中把原核表达的重组E蛋白作为诊断抗原从而建立了检测DTMUV抗体的间接ELISA方法。谢星星等^[34]用NS1蛋白包被酶标板,建立了检测DTMUV抗体的间接ELISA方法。各类研究表明ELISA检测方法的高敏感性、特异性和快速为基层实验室、兽

医站和养殖场诊断鸭坦布苏病毒提供了新的方法。

2.4.2 乳胶凝集试验

乳胶凝集试验具有简单、快速的特点,对基层养殖场快速诊断有指导意义。万春和等^[35]研制了一种DTMUV乳胶诊断试剂,也建立了相应的检测DTMUV的LAT方法,其与间接ELISA方法的阳性符合率达到了85.3%。施少华等^[36]同时运用乳胶凝集试验和RT-PCR两种方法,对73份自然感染的病料组织进行检测,检测结果表明阳性结果分别为27份、31份,两者的阳性符合率达到87.1%。

3 展望

鸭坦布苏病毒病是一种急性、接触性新的禽传染病,也是鸭病中的主要流行病之一,给我国养禽业带来了较大的经济损失。DTMUV的诊断方法很多,有临床诊断、病毒分离鉴定、分子生物学诊断(RT-LAMP、常规RT-PCR、荧光定量RT-PCR、套式PCR方法、核酸探针)、血清学诊断(ELISA、乳胶凝集试验),这些诊断方法为有效控制鸭坦布苏病毒的传播和流行提供了技术指导。但各诊断方法有各自的弊端,例如常规RT-PCR方法不能准确进行定量且灵敏度有限;RT-LAMP方法因为灵敏度太高会导致假阳性。随着分子生物学技术的不断发展,大量学者在此领域不断深入研究,鸭坦布苏病毒病的诊断和防控技术也将日趋完善和成熟。

参考文献:

- [1] 曹贞贞,张存,黄瑜,等.鸭出血性卵巢炎的初步研究[J].中国兽医杂志,2010,46(12):3-6.
- [2] Yan P, Zhao Y, Zhang X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. Virology, 2011, 417(1):1-8.
- [3] Tang Y, Diao Y, Yu C, et al. Characterization of a Tembusu virus isolated from naturally infected house sparrows (Passer domesticus) in Northern China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2013, 60(2):152-158.
- [4] Yan P, Zhao Y, Zhang X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. Virology, 2011, 417(1):1-8.
- [5] Su J, Li S, Hu X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by

- BYD Virus, a new Tembusu-related flavivirus [J]. Plos One, 2011, 6(3):18106.
- [6] 廖敏, 牟小东, 耿阳, 等. 鸭传染性产蛋减少症(暂定名)的病原分离初报[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 19(1): 22-26.
- [7] 陈仕龙, 陈少莺, 王勋, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业科学, 2011, 26(2):170-174.
- [8] 林建, 韩春华, 刘月焕, 等. 鸡对鸭出血性卵巢炎病毒(黄病毒)易感性的研究田中国畜牧兽医学会禽病学分会第十六次学术研讨会论文集.
- [9] 朱丽萍, 颜世敢. 鸭坦布苏病毒研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2012, (01):79-82.
- [10] 于春梅, 刁有祥, 唐熠, 等. 坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21):4492-4500.
- [11] 李成益. 鸭坦布苏病毒的流行病学调查与致病性研究[J]. 山东畜牧兽医, 2014, 35(05):86
- [12] 张英, 赵丹丹, 刁有祥, 等. 坦布苏病毒在种鸭中的垂直传播[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(11):1847-1852.
- 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋)鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2010, 25(6): 663-666.
- [14] 李玉峰, 马秀丽, 于可响, 等. 一种从鸭新分离的黄病毒研究初报[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(6): 885-891.
- [15] 陈仕龙, 陈少莺, 王勋, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2):170-174.
- [16] 欧全宾, 刁有祥, 唐熠, 等. 鸭坦布苏病毒 E 基因环介导等温扩增检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(9):1329-1332.
- [17] Yan L, Peng S, Yan P, et al. Comparison of real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification and realtime reverse transcription polymerase chain reaction for duck Tembusu virus [J]. Journal of Virological Methods, 2012, 182(1-2):50-55.
- [18] 王林川, 李庆阳, 陈瑞爱, 等. 鸭出血性卵巢炎广东病例报道及其 RT-PCR 方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(06):27-29.
- [19] 赵虹, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒和禽流感病毒多重 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(3): 90-93.
- [20] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 鸭出血性卵巢炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2011, 26(1):10-12.
- [21] 孙敏华, 李林林, 董嘉文, 等. 鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒二重 PCR 检测方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(1):29-31.
- [22] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒与鸭圆环病毒二重 RT-PCR 方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(12):44-47.
- [23] 王楠楠, 刘芳, 许漩, 等. 坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医科学, 2015, 45(01):15-19.
- [24] Yan L P, Yan P X, Zhou J W, et al. Establishing a TaqMan-based real-time PCR assay for the rapid detection and quantification of the newly emerged duck tembusu virus [J]. Virology Journal, 2011, 8:464.
- [25] 靳宇田, 黄显明, 许秀梅, 等. 鸭坦布苏病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(4):46-50.
- [26] 曾婷婷, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 应用二重实时荧光定量 RT-PCR 鉴别坦布苏病毒与产蛋下降综合征病毒 [J]. 中国家禽, 2015, 37(1):17-21.
- [27] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒和鸭瘟病毒二重荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3):77-82.
- [28] 黄欣梅, 赵冬敏, 刘宇卓, 等. 禽黄病毒套式 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(6):5-8.
- [29] 张琳, 胡北侠, 颜世敢, 等. 鸭黄病毒巢式 RT-PCR 检测方法的建立和应用[J]. 福建农业学报, 2012, 27(2):124-129.
- [30] 颜丕熙, 李国新, 吴晓刚, 等. 应用套式 RT-PCR 快速检测鸭坦布苏病毒[J]. 中国动物传染病学报, 2011, 19(3):34-37.
- [31] 高绪慧, 刁有祥, 唐熠探, 等. 针检测鸭黄病毒的地高辛标记 DNA 的制备与应用 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(4): 525-528.
- [32] 钮慧敏, 李银, 黄欣梅, 等. 间接 ELISA 方法检测抗鸭源坦布苏病毒抗体 [C]//北京: 中国畜牧兽医学会禽病学分会第十六次学术研讨会论文集, 2012, 10:106-107.
- [33] 郝明飞. 鸭坦布苏病毒包膜蛋白的原核表达间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医学会禽病学分会第十六次学术研讨会论文集.
- [34] 黄梅欣, 李银, 赵冬敏, 等. 新型鹅黄病毒毒株 JS804 的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2011, 27(2): 354-360.
- [35] 万春和, 傅秋玲, 陈珍, 等. 乳胶凝集试验方法在检测鸭坦布苏病毒抗体中的应用[J]. 福建农业学报, 2013, 28(12):1200-1203.
- [36] 施少华, 万春和, 傅光华, 等. 检测鸭坦布苏病毒乳胶凝集试验的建立及初步应用[J]. 福建农业学报, 2014, 29(4):306-309.

浅谈魏氏梭菌对养猪生产的危害及防治措施

陈辉, 肖定福*

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:魏氏梭菌是一种造成猪传染性坏死性肠炎、猪梭菌性肠炎和仔猪肠毒血症的致病菌。该菌可导致仔猪红痢、育肥猪种猪猝死症等魏氏梭菌病, 给养猪生产带来了巨大危害。目前我国对于该病的防治措施是采取药物治疗、加强饲养管理、免疫治疗以及基因工程疗法等措施。本文就该菌给养猪生产带来的危害加以综述, 旨在提出有效的防治措施, 减少该菌对养猪生产造成的损失。

关键词:CP; 魏氏梭菌病; 养猪生产; 防治措施

中图分类号:S852.6 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2017)06-0011-04

魏氏梭菌(CP, *Clostridium perfringens*)是一种革兰氏阳性菌, 分为A、B、C、D和E型, 广泛分布在土壤、污水、饲料、畜禽粪便中, 是一种典型的条件性致病菌^[1-4]。CP于1892年被英国人Welchii从一个腐败人尸体中产生气泡的血管中分离得到。CP可造成仔猪红痢^[5], 是造成育肥猪和种猪猝死症的主要病原菌^[6], 给养猪生产带来了巨大的经济损失。目前我国猪场对该病的防治措施主要是加强饲养管理、采取药物(青霉素、甲硝唑注射液等)治疗、基因工程疗法以及免疫防治。本文就CP的理化特性、发病机制、对养猪生产的危害以及防治措施, 以期对养猪生产提供有效的防治措施, 降低CP对养猪生产带来的危害。

1 CP的理化特性

CP的形态特征为两端钝圆, 粗大杆菌, 单在或成双排列, 短链较少, 无鞭毛, 不能运动, 在动物机体里或含血液的培养基中可形成荚膜, 无芽孢, 为革兰氏阳性菌。CP株纯培养物能发酵乳糖(Lactose)、麦芽糖(Maltose)、果糖(Fructose)、葡萄糖(Glucose), 并产酸产气; 不发酵甘露醇(Mannitol)、鼠李糖(Rhamnose)和靛基质(Indole); CP不含丙酮酸脱羧酶, 故甲基红(M.R)试验和二

乙酰(V-P)试验呈阴性^[5]。CP的营养类型为异养厌氧型, 对营养要求、厌氧要求不高。部分5+--+**++CP菌可使牛肉块变成为粉红色。CP在厌氧肉肝汤中生长迅速, 产生大量气体H₂S。CP能还原硝酸盐, 但不产生吲哚, 可在含铁牛乳中呈“暴裂发酵”。在普通培养基上均易生长, 培养物在葡萄糖血液琼脂平板培养48 h菌落直径为1~2 mm, 形态特征为圆形、光滑、隆起、淡黄色、直径2~4 mm、有的形成圆盘形, 边缘成锯齿状, 菌落周围出现β溶血环。多次传代后, 表面有辐射状条纹的“勋章”样且菌落周围有棕色溶血区。有时为双环溶血, 内环透明, 外环淡绿色^[7]。

2 CP病的症状及发病机制

2.1 CP病的发病症状

CP病发病急, 呈地方性流行, 发病率和致死率非常高, 是一种危害养猪生产的一种急性传染病。通常病猪的主要症状为体温升高, 可高达39℃左右, 出生后15天的仔猪容易发病, 使仔猪出现腹泻, 排出的粪便为褐色或深绿色, 伴有恶臭, 传播速度快, 1周内同窝仔猪均会被传染而死亡^[8]。由于病猪体温的升高、病情的恶化会导致病猪全身肌肉震颤, 出现共济失调、运动障碍; 严重

收稿日期:2017-09-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31640078), 湖南省科技厅项目(2015RS4035), 湖南省教育厅资助科研项目(16A096)

作者简介:陈辉(1995-), 男, 湖南衡阳人, 本科在读, 研究方向为单胃动物营养生理调控. E-mail:1406876078@qq.com

*通讯作者:肖定福, 女, 博士, 副教授, 主要从事动物营养生理研究

时会导致病猪后肢麻痹,无法站立,四肢呈滑水状,不停的磨牙,且伴有白沫从口腔流出,迅速死亡,尸体腹部出现明显胀气^[9]等。张雪梅^[10]发现病猪表现为精神萎靡,食欲降低但饮水的频率增加,腹部会出现胀气,并且病猪的唇部、蹄部和耳尖会出现发绀症状,伴有呼吸困难,口吐白沫,鼻孔流出血红色液体,肌肉振颤和剧烈抽搐,四肢呈游泳状滑动,病猪表现烦躁不安,不停撞圈,发出怪叫声,在2~3 h内死亡。CP病主要是导致猪群肠道病变造成的一系列症状,造成猪群的急性死亡。

2.2 CP病发病机制

CP分布广泛,容易感染饲草和猪饲料,猪采食被污染的饲料而致病。当猪采食含CP的饲料后,CP进入肠道而大量繁殖,造成猪肠道紊乱,从而降低猪免疫机能;另外由于CP在猪肠道大量繁殖后产生大量气体,无法及时从肛门排出,使得胃肠出现明显的臌胀,进而压迫心脏和肺部,影响了气体交换和血液循环,发生呼吸障碍,使得猪窒息而死^[10]。CP大量繁殖分泌具有致病作用的外毒素,毒素进入血液导致猪只死亡。张印学^[11]认为,家畜采食了被CP污染的饲料或饮水时,使CP进入体内大量繁殖,破坏肠道的微生态平衡,造成抵抗力下降和剧烈应激,同时CP的大量繁殖会在肠道产生大量的外毒素,这些外毒素会黏附于肠粘膜上皮,使肠壁的通透性增加,阻碍了氨基酸等营养物质的吸收和运输;而且这些外毒素进入血液循环系统,造成败血症,进而导致机体心脏、肝脏、肾脏和脑等器官衰竭而造成死亡。仔猪的染病是由于母猪肠道内的CP,母猪由于应激反应造成机体免疫性能降低时等,肠道内的CP会大量繁殖后,可以通过粪便排出体外,污染母猪乳头和垫草,当仔猪误吮被CP污染的乳头后,CP进入仔猪胃肠道,由于仔猪免疫系统发育不完善,CP可在仔猪肠道内大量繁殖产生大量毒素,造成仔猪组织和器官的坏死而导致死亡^[9]。

3 CP对养猪生产的危害

3.1 对仔猪的危害

CP对仔猪的危害主要是导致仔猪红痢(也叫传染性坏死性肠炎或仔猪肠毒血症)。Miyamoto等

认为羔羊痢疾和羔羊、牛犊、仔猪、家兔、雏鸡等的坏死性肠炎等疾病的主要病原是CP^[12]。仔猪红痢是由C型产气荚膜梭菌引起的^[5],该病主要侵害出生3 d以内的仔猪,发病急,发病率可达40~50%,死亡率高达100%^[13]。据张红英等^[14]报道,最急性的临床症状不明显,一出现症状就迅速死亡,有些感染该病后3 d内全窝仔猪死亡。李晓鑫^[15]发现,感染该病的仔猪在初期会排出黄色稀软粪便,然后排出含有大量灰色组织碎片的水样稀便,由于体质虚弱,身体消瘦,生长性能受阻,最终由于机体大量脱水而导致死亡,仔猪死亡日龄多为5~7日龄。该病具有较高的死亡率,据李福勇报道^[16],重庆市某猪场有47头仔猪发病死亡29头仔猪,给该猪场带来巨大经济损失。

3.2 对生长育肥猪的危害

CP对育肥猪的危害表现在引起育肥猪猝死症(*Sudden Death Syndrome*, SDS),使育肥猪迅速死亡,从而给养猪生产带来巨大经济损失。C型魏氏梭菌是造成畜禽SDS的主要病原菌,该菌的主要致病毒素是 α 和 β 外毒素,毒素具有良好的免疫原性^[17]。SDS发病急,通常没有任何征兆而突然死亡,无前期症状,通常因来不及治疗而死亡,因而给养猪生产带来了巨大的经济损失。该病呈地方流行性,无明显的季节性,具有明显的传染性,病程短且致死率很高^[18]。林正文等^[19]报道白山市某养猪场育肥猪死于圈舍,尸体腹部鼓胀、发紫;随后出现3头育肥猪食欲废绝,体温高达40.5℃,步态不稳,呼吸急促,在发病几分钟或几十分钟内迅速死亡,且无任何先兆;经尸体剖检、分离培养和实验诊断致病菌为魏氏梭菌,认为是CP导致育肥猪猝死。肖立新等^[20]也发现永顺县某养殖场饲养的7头育肥猪突然发病死亡5头,病猪表现为体温升高,肌肉振颤,有白色液体从嘴角流出,病猪迅速死亡;结合流行特点、病理剖检、病原菌诊断以及实验室诊断,诊断结果为致病菌为CP,该病为SDS。

3.3 对种猪的危害

CP对种猪造成的危害是使种猪患SDS,迅速死亡。李西康^[21]发现山东省临沂市河东区某自繁自养种猪场饲养的1头妊娠45 d的母猪和2头空怀母猪表现为食欲废绝,排出黄褐色酸臭的水样粪

便, 体温高达40.5℃, 呼吸急促, 口鼻有白色泡沫样液体, 全身肌肉振颤, 在2 d内死亡; 经实验室诊断致病菌为CP。据高新发等^[22]报道, 通辽市某养猪场先后有6头怀孕母猪突然猝死, 病猪生前表现症状为呕吐、腹部肿胀、口鼻流出泡沫样液体, 3 d内死亡; 对病猪剖检发现十二指肠到回肠段臃气明显, 肠壁呈淡黄色, 经实验室诊断致病菌为CP。同时CP也会对种公猪造成很大危害, 种公猪的发病率也较高。李小红^[23]报道, 2013年广西贺州某猪场出现种公猪迅速死亡的案例, 种公猪生前的症状表现为呼吸困难, 耳尖和嘴唇出现发绀, 精神沉郁, 食欲废绝, 嘴角流出白色泡沫样液体, 全身肌肉振颤, 出现呻吟, 次日迅速死亡, 死后腹部臃胀明显。CP也会造成后备种猪的猝死, 王加利^[24]发现天津东丽区某猪场后备种猪先后10天内死亡7头后备种猪; 死猪生前均没有任何异常症状, 采食和饮水均很正常, 但在次日清晨突然死亡, 有的在采食过程突然倒地、呼吸困难、四肢抽搐、嘴角流出泡沫样液体, 在几分钟内死亡, 死亡腹部迅速膨胀, 经微生物诊断致病菌为CP。CP对种猪造成SDS, 使种猪突然死亡, 严重影响了产仔数, 显著降低了种猪的繁殖性能, 给种猪场和自繁自养猪场带来巨大经济损失。

4 CP病的防治措施

4.1 加强饲养管理

CP给养猪生产带来巨大损失, 仔猪和种猪致死率都非常高, 因而要注重加强猪场饲养管理, 改善猪场环境, 提高猪只的综合抵抗力, 方可有效地防治CP病大发生, 降低CP给养猪生产带来的经济损失。一般来说CP并不会直接致病, 但在不当的饲养管理条件下(突然换料、饲养密度过大等)造成猪只应激, 免疫力下降, 使CP大量繁殖, 进而使猪只患病^[14, 25]。赖蕴^[26]认为对于体质瘦弱的猪在气候变冷时要做好防寒工作, 避免气温下降造成机体抵抗力下降, 还应加大饲料的投喂量, 可增加日常饲料的1/3, 可以有效地降低CP的感染。乔济友^[27]认为在饲料中添加微生态制剂如芽孢杆菌、乳酸菌等, 这类物质在猪只肠道内生长发育会消耗肠道中的氧气, 形成厌氧环境有效地抑制CP繁殖, 进而有效地防治被CP感染。除

此以外, 注重猪只日粮的配制和饲喂也有效。王开功^[28]认为饲料的配制应提高粗纤维的含量、适当减少高能高蛋白日粮, 经常补饲硒、铜等微量元素和维生素E等维生素; 饲喂要定时、定量, 换料要有过渡, 减轻猪只肠道压力, 进而抑制CP的繁殖。另外, 加强猪舍的消毒, 定期用过氧乙酸、聚维酮等消毒药消毒; 转群时避免猪只应激, 尽量选择早晚比较凉快的时间段。

4.2 药物治疗

CP属于革兰氏阳性菌, 大部分抗革兰氏阳性菌的抗生素和化学合成药如青霉素等对CP有较好的防治作用。乔济友^[27]隔离病猪治疗, 给每头病猪每头静脉注射含0.2%甲硝唑的生理盐水500 mL, 肌注鱼腥草20 mL和头孢噻吩钠1 g; 在断奶仔猪下产床后保育舍后, 在日粮中添加0.1%的地美硝唑和0.2%的金霉素进行饲喂, 经一个疗程10天后有效的控制了CP病。甘昌银^[29]用链霉素100 mg、青霉素10万IU与蜂蜜调成糊, 抹入病仔猪舌根部, 配合痢菌净等药物, 服用2~3 d有效。据李德如^[30]报道, 给猪场全场的饮水中添加0.1%的瑞福隆(主要为乳酸菌和环丙沙星)和0.1%的甘草颗粒(黄芪多糖、甘草酸和板兰根), 饮用3 d后, 将瑞福隆和甘草颗粒剂量减半, 再服用7 d后, 1个多月后猪场无猪急性死亡。青霉素对CP具有良好的防治效果, 对病猪的防治也可采取交叉注射磺胺嘧啶及青霉素; 前5 d注射0.2 ml/kg的磺胺嘧啶注射液, 每天一次, 连续使用5 d; 后5天注射青霉素20~30 mg/kg, 每天2~3次, 连用5天, 可以有效地控制CP病, 降低其给养猪生产带来的损失^[10]。注意不能滥用抗生素, 否则会导致耐药菌株的出现, 增加防治CP病的难度^[31]。

4.3 基因工程疗法

随着基因工程技术的发展, 人们对CP的防治思路转向了CP的基因, 利用CP基因的结构特性, 针对性运用基因工程技术增强猪群对CP病的抵抗力, 从而对CP病进行有效地防治。许崇利等^[32]对α毒素的克隆与表达进行了研究, 发现通过注射魏氏梭菌α毒素基因敲除突变体可以降低毒素的致病性; 同时, 许崇利等^[33]通过定点突变技术改变了A型魏氏梭菌α毒素Asp-56基因生物学活性, 有效地去除了毒素的磷脂酶C活性, 降低了A

型CP的致病性。Felipe等^[34]发现由大肠杆菌表达产生的重组产气荚膜梭菌 α 和 β 1类毒素二价疫苗(重组蛋白)对母猪和仔猪体内抗体水平的影响,结果显示该重组蛋白疫苗可以有效地诱导母猪和仔猪免疫反应,表明该重组蛋白可以有效地预防A型和C型产气荚膜梭菌引起的仔猪腹泻。Zeng等^[35]用融合表达的 α - β 2- β 1类毒素去诱导母猪免疫,结果发现母猪的血清中检测到了 α - β 2- β 1类毒素蛋白的抗体,表明该如何毒素有效提高了母猪对CP的抵抗力。Felipe等^[34]的研究也表明CP α - β 2- β 1类毒素可提高母猪产前被动体液免疫水平,这一研究为融合表达类毒素预防仔猪痢疾提供了理论基础。表明通过基因工程在CP上的应用,有效地防治了CP病,降低了其带来的经济损失。

4.4 免疫防治法

CP病发病急,病程短,使用抗生素不能有效地根除,但通过接种疫苗等措施提高机体对CP的免疫能力,可以有效地防治。殷娟岭^[8]认为在产前一个月给母猪接种1次魏氏梭菌多价苗,随后经过14天后再次接种,可使后代仔猪通过吮吸初乳获得有效抵抗CP的抗体。该病要注重预防,对于发病点可采样分离菌株,并通过甲醛灭活,加入佐剂氢氧化铝制成灭活疫苗,对易感猪进行紧急接种,间隔14~28天注射2次,加强免疫注射,可以有效地防治CP病;对妊娠母猪在产前1个月注射CP-甲醛-氢氧化铝类毒素5 ml,15 d后在注射8 ml^[7]。近年来,众多研究者将疫苗的研究思路转向基因工程亚单位疫苗和核酸疫苗等新型疫苗。Pilehchian等^[36]将CP的 ϵ 和 β 基因进行了融合,并且部分表达出了与天然蛋白具有相似生物学活性的可溶蛋白,结果显示该蛋白可以有效地提高机体对CP的免疫。核酸疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因直接导入动物体细胞内,并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白,通过一系列的反应诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病CP的目的^[37]。

5 小结及展望

CP分布广泛,致死率非常高,可造成仔猪红痢,育肥猪和种猪猝死症,给养猪生产带来了巨大的经济损失。目前对于该病的防治主要措施有

加强饲养管理、药物治疗、基因工程防治以及免疫防治,通过这些措施可有效降低CP病的发病。随着人们对CP研究的不断加深,对其致病机理越来越清晰,提出了用微生态制剂如抗菌肽等绿色添加剂进行防治,降低抗生素的滥用。同时随着分子生物学技术的发展,对其的诊断技术越来越多和越准确,如利用核酸探针的方法对CP快速诊断以及基因分型,比传统的方法更灵敏可靠;同时人们也研制出了基因工程亚单位疫苗和核酸疫苗提高了机体的抵抗力;利用基因敲除等技术有效的降低CP的毒性等。但目前对于CP介导的单一毒素的特定致病机制仍不十分清楚,需要进一步研究,相信随着分子生物学技术的进一步发展,其发病机制将会越来越明确,人们会研究出更有效的防治措施,降低CP给养猪生产带来的危害,促进我国养猪业安全稳健的发展。

参考文献:

- [1] Yongi S, Matsuda S, Kawai T, et al. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks [J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(6):2390-2399.
- [2] Bokori-Brown M, Hall C A, Vance C, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia [J]. *Vaccine*, 2014, 32(23):2682-2687.
- [3] Tobin C A, Sanger J R. *Clostridium perfringens* infection following carpal tunnel release [J]. *Hand (N Y)*, 2013, 8(1):64-66.
- [4] Silva R O, Santos R L, Pires P S, et al. Detection of toxins A/B and *Clostridium perfringens* from dogs in Minas Gerais, Brazil [J]. *Braz J Microbiol*, 2013, 44(1):133-137.
- [5] 刘泽文,熊忠良,杨克礼,等.新生仔猪红黄痢二联灭活疫苗的研制与应用 I-C型魏氏梭菌生物学特性研究[J].安徽农业科学,2008,(21):9063-9064.
- [6] 孔庆娟,刘马峰,任家琰.魏氏梭菌引起家畜“猝死症”的研究进展[J].畜禽业,2010(08):20-23.
- [7] 盛卫东.魏氏梭菌病的诊断与综合防治[J].农技服务,2013,30(2):173-175.
- [8] 殷娟岭,吕蔚.猪魏氏梭菌病的临床特点、实验室诊断及其防控[J].现代畜牧科技,2017(4):88.
- [9] 裴焕军.猪梭菌性肠炎病原、症状及防治措施[J].现代畜牧科技,2016(5):87.
- [10] 张雪梅.猪魏氏梭菌病的诊断与治疗[J].现代畜牧科技,2016(1):66.

种鸡人工授精操作中存在的问题与对策

韩文格

(河北飞龙家禽育种有限公司, 河北 石家庄 050091)

摘要: 本文将种鸡人工授精操作中容易忽视的细节问题进行分析总结, 并提出相应的解决方案, 供种鸡场管理者参考。

关键词: 采精; 输精; 稀释; 检测

中图分类号: S814.3 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2017)06-0015-01

随着养禽集约化程度的提高, 种鸡场精越来越普遍采用人工授, 笔者结合亲身实践, 指出人工授精操作中存在的问题, 并提出相应的对策, 以期引起同行们关注, 不断优化人工授精技术。

1 存在的问题

1.1 工人体能和视力较差

人工授精是种鸡生产中比较繁重的工作, 一般要求4~5天输精一次, 一般2名工人半天完成1000多只鸡的输精任务, 工作量大且单调枯燥。再加上种鸡场防疫要求严格, 均是封闭式管理, 较难留住青壮年人员, 参与养鸡的大多是中老年工人, 他们不仅难以承受人工授精这样繁重的体力劳动, 而且因视力问题无法精准的进行输精工作。

1.2 人员之间配合不默契

人工授精是每天必做的工作, 有时有的工人身体或心情不舒服, 在翻肛或输精时带有情绪, 影响整组的受精率。另外, 工人更换熟练程度不高、配合不默契, 例如, 翻肛人员左手掌用力过大不利于母鸡的健康, 并且造成输精困难, 或者输精后放鸡过早、推母鸡腹部进笼, 都会将精液挤出来, 导致受精率下降。

1.3 使用原精液的缺点

现在许多种鸡场均采用公鸡的原精液输精, 殊不知原精液有许多缺点: 一是原精液保存时间短, 需要在采精后30分钟内用完, 否则精子发生凝集现象引起精子死亡, 受精率下降; 二是原精液密度过高容易发生凝集的同时, 精子代谢释放更

多的有害物质, 造成精子中毒, 活力下降; 三是需要饲养更多的公鸡, 且采精工作量加大。

1.4 不注重公鸡发育状况

许多种鸡场将公鸡放到鸡舍的最后面, 或者单独放到一个鸡舍让母鸡舍的人员轮流管理, 工人在饲养中就会把公鸡当成附属品, 最后给水喂料, 护了公鸡的营养状况和体重变化, 只有在受精率发生降低后才回头查找公鸡的原因, 为时已晚。

1.5 不检测公鸡精液

公鸡的精液质量不是一成不变的, 即优秀的公鸡不一定一直保持优秀状态, 公鸡会随着营养的增多或减少、外界环境条件的变化以及因疾病造成睾丸器质性变化等, 其精液质量将发生改变。目前大部分种鸡场没有显微镜, 也不会检测公鸡精液, 当发生鸡群受精率降低时, 就认为工人操作失误造成的, 很长一段时间查找不到受精率下降的真正原因, 这样的管理很被动, 直接带来较大的经济损失。

1.6 直接拔掉公鸡尾毛

笔者在东北地区走访时看到许多种鸡场在训练公鸡时, 感觉公鸡尾部羽毛太多不好抓住, 还有一个主要原因是怕肛门下面的羽毛污染精液, 为此干脆将公鸡肛门周围的羽毛用手拔掉, 这种残忍的做法会直接损伤皮肤, 给鸡只带来较大的应激, 殊不知是羽毛不仅可以保护鸡体免受外力损伤, 还可以保持体温, 从而减少饲料用量。

2 对策与建议

2.1 招收年轻工人

收稿日期: 2017-09-19

作者简介: 韩文格(1969-), 女, 河北石家庄人, 高级畜牧师, 主要从事种鸡饲养管理。E-mail: 739695930@qq.com

(下转第21页)

加强鸡群饮水管理的措施

郝春光

(河北飞龙家禽育种有限公司, 河北 石家庄 050091)

摘要: 饮水管理是我养鸡过程中不可忽视的重点, 本文详述了水质、水温、水流量等几方面的饮水管理, 供同行参考。

关键词: 水质; 水线; 加药器; 水流量

中图分类号: S831.4+3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-8567(2017)06-0016-03

水在鸡体内含量最多, 一般占体重的70%以上。它参与消化吸收和体温调节等代谢反应, 是鸡体重要的营养物质。只有给鸡群提供充足的清洁饮水, 才能满足其生长发育需要和维持较高的生产性能。刚入舍雏鸡尽早饮水, 有助于鸡体清理肠道、排出胎便、促进雏鸡代谢, 还可加快卵黄的吸收利用、提高免疫力。

1 水质管理

鸡群要求的饮用水为无色、无味、透明, 总硬度保持在60~180 mg/L, PH值在6.5~7.8之间为宜, 每毫升水中细菌总数应低于100个。其中可溶性固体物、碳酸钙、硫酸钙、硝酸盐、亚硝酸盐、铁、锰、铜、锌、钠等含量应符合饲养管理指南上的饮水质量标准。

目前, 鸡场绝大部分选用地下水作为饮用水, 基本符合要求, 但有时存在总硬度偏高、细菌总数超标、汞和铅等有害物质严重超标的问题, 所以建场前一定要对水质进行检测, 只有符合要求的情况下才允许建场。另外, 鸡群的饮水系统由于水速慢、水温高、存在微生物藏匿处, 这些都是病原微生物的繁殖有利条件。因此, 为了给鸡群提供干净的饮水, 水质管理非常重要。

2 水温管理

水温是维持鸡群体重和生产性能的重要条件, 因为水温直接关系到鸡群饮水量的多少, 水

温适宜时鸡体饮水非常舒服, 否则饮水量会下降甚至拒绝饮水, 同时水温忽高忽低也会给鸡群带来较大的应激。育雏前2~3周要求水温为25~26℃, 这样不仅能促进雏鸡饮水还有助于其保持体温、提高成活率。3周后理想水温是18~21℃, 因此在饲喂鸡只时应随时检测饮水温度, 保证水温适宜以促进鸡群健康生长。

一般情况下, 水温会随着外界温度的变化而变化, 建议对饮水管道进行处理, 即室外管道必须深埋地下1米, 避免冬季冻裂管道或冻结饮水或者夏季地表温度高致使水温过高。室内的供水管道应用保温材料包扎严实。冬季水温低时, 应将水接入大的容器进行预温; 夏季水温高时最好在供水处添加冷却装置, 这样就可以保证水温处于适宜的温度范围。

3 水线管理

3.1 悬挂平直

当水停滞于水箱、饮水管中时, 其中的藻类、病原菌等活性物质会迅速繁殖形成一种生物膜, 尤其在水线低陷处饮水长期沉积成为大肠杆菌、沙门氏菌、链球菌等港湾, 时刻危害着鸡群的健康。这亦是一些鸡群长期患有肠道疾病的原因之一。因此建议鸡舍在尽量不使用水箱的基础上, 确保水线悬挂平直并安装电击线, 防止鸡只踩踏下沉形成凹陷。

3.2 清洗消毒

利用水线的反冲洗装置, 每周定期对水线进行冲洗, 将水线中排出的污水沿着地面放到舍外, 以

免微生物停留在舍内。可以使用6~10 ppm的二氧化氯来消毒水线，并确保游离氯浓度达1 PPM，常用的有5~7%亚氯酸钠，氯化消毒最佳PH值范围是4~7。最新资料建议使用过氧化氢消毒，空舍时配制2~3%的过氧化氢在水线中停留1~3天，并将水线中的调压器、分水管等各部位冲洗消毒。过氧化氢还可以作为日常消毒剂在水线中使用，浓度为25~50 ppm。

4 加药器管理

在实际生产中一般不重视加药器的管理，尤其是不及时测定加药器的剂量，这样就无法保证药物或消毒剂的有效浓度和用水量。建议最少运行20升水才可以评估加药器的准确性，否则水量不足很难正确评估。同时安装水表也很重要，这样可以通过检查每分钟进入水管中的水流量，来进一步检测加药器。另外加药器双侧的软管较细，常常会发生堵塞影响水流量，应及时清理疏通。

5 保证饮水充足

我们均知道饮水量是饲料量的2倍，随着舍内温度的升高饮水量增加，夏季天气炎热时会增加到3~4倍，甚至是6~8倍。目前许多鸡场在人工授精时怕粪便太稀不方便操作，所以均对鸡群进行限水，有时限水工作做得不合理，只是盲目的采取一致的限水方案，殊不知在舍温升高、水线或乳头漏水、鸡群感染疾病时饮水量会突然增加，而在水压较低、供水不足、水线中有堵塞时会造成鸡体缺水、采食速度慢、采食量减少、体增重不足以及产蛋率、受精率下降等，如果不及时采取措施会危害鸡群生命降低成活率。因此应随时调节能限水计划，充分满足鸡群需要。

为了确保鸡只有充足的饮水，应在鸡群采食饲料3小时后，触摸鸡只嗉囊，当饮水不足嗉囊内会充满坚硬的饲料，有的在下午嗉囊内还存在很多没有消化的饲料说明供水不足。应特别关注后面的鸡只，因为水线开启和关闭时，均是后面的水线先断水，并且给水后往往由于气阻的原因而致使后面水线中的饮水无法充满管道。

6 水流量检查

规模化养鸡场最新要求必须定期检查水流量，以确保饮水供应能满足鸡群每天饮水量的最大需求。水流量低于标准时会引起鸡群饮水不足，但是水流量也不能超过要求，否则会因乳头漏水致使垫料潮湿板结、质量变差，影响鸡足部与腿部健康，同时舍内湿度较大、病菌大量增殖易诱发肠道疾病，尤其是球虫病。鸡群不能正确地触到乳头而造成饮水量下降。

每周检查一次乳头饮水器的水流量，第一次应在进鸡前检查，然后每周检查一次。但是最好每周检查鸡群的饮水量，因为饮水量的突然变化有可能是水流量不正确的先行指征之一。检查水流量需要的设备有：量杯（最好带有乳头触碰装置）、定时钟或秒表、记录表格、笔或铅笔。

6.1 水流量检查步骤

首先走到离调压器最远的饮水乳头位置，这通常位于水线调压器的另一端，将量杯放到该饮水乳头下面。然后开启定时钟或秒表同时触碰乳头使水自然地流到量杯中，如果量杯不带乳头触碰装置可以用手指按住乳头，当定时钟或秒表走到30秒时松开乳头，停止将水进一步流到量杯中。最后记录量杯中的水量（毫升），将这一数字乘以2得到每分钟的水流量。

6.2 水流量检查结果分析

为了使鸡群在整个生命周期中获得适当的饮水量，乳头饮水器的水流量应该随着鸡群日龄增长而增加。从饮水乳头处检查水流量，确认适当的静态流量。检查不同地方的水流量可以观察鸡群饮水量，建议乳头饮水器的水流量分别为：0~7日龄20毫升；7~21日龄60~70毫升；大于21日龄为70~100毫升。如果水流量与推荐的不一致时应采取如下措施。

当水流量小于推荐流量时，应确保饮水系统已打开，并在水线的调压器端调高水压。同时通过触碰乳头或拧开水线释放空气直到水能自由流出，确保水线没有气阻或堵塞。然后确保水线处于水平状态，检查乳头是否有堵塞，如果存在堵塞情况可以用推荐的产品清洗或者如有必要更换乳头。检查调压器橡皮密封圈是否存在或者是否处于正确的工作状态，如有必要更换密封圈。当水流量大于推荐量时，首先在水线的调压器端调

低水压,并通过触碰乳头或拧开水线释放空气,直到水能自由流出,确保水线没有气阻或堵塞。根据水线发生气阻或堵塞位置的不同,可能会造成水压增加或降低,例如水线末端发生堵塞会增加该位置之前的乳头水压。

加药器两侧的软管较细往往会明显影响水量,应保证此处畅通无堵塞。调压器容易发生老

化失去原有功能,应及时检查维护调压器,保证其始终处于正确的工作状态,并避免调压器里面的滤网形成生物膜或粘性物质而发生堵塞。切记水流量和水压不一样,水压高时水流量快,应该保持水压管(内部有一个球)干净透明,这样才能看清楚水压在哪,因为水压管变脏时没法用作调压的工具。

(上接第14页)

- [11] 张印学. 小尾寒羊猝死症诊断和防治报告[J]. 畜禽业, 2006, 12(10):51-53.
- [12] Miyamoto K, Li J, Sayeed S, et al. Sequencing and diversity analyses reveal extensive similarities between some epsilon- toxin-encoding plasmids and the CPF5603 Clostridium perfringens enterotoxin plasmid[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(21): 7178-7188.
- [13] 阎喜军, 闫新华, 王长凤, 等. 鹿魏氏梭菌制苗菌株生物学特性的研究[J]. 特产研究, 1999(4):5-8.
- [14] 张红英, 卢中华, 杨霞, 等. 我国魏氏梭菌病的流行特点[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(1):39-41.
- [15] 李晓鑫. 仔猪梭菌性肠炎的临床症状、鉴别诊断及防控[J]. 现代畜牧科技, 2017(1):79-80.
- [16] 李福勇, 丁大伦. 仔猪魏氏梭菌病的诊断与防治[J]. 农家科技, 2011(11):37-38.
- [17] 柴同杰, 刘文波. 魏氏梭菌类毒素疫苗研制及其免疫家兔抗体消长规律[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1):101-104.
- [18] Matsushita C, Matsushita O, Katayama S, et al. An upstream activating sequence containing curved DNA involved in activation of the Clostridium perfringens promoter [J]. Microbiology, 1996, 142(9): 2561-2566.
- [19] 林正文, 曹金荣, 王丽芹, 等. 一起魏氏梭菌引起的育肥猪猝死症的诊疗报告[J]. 吉林畜牧兽医, 2014(5): 32-33.
- [20] 肖立新, 彭秀武, 田艳. 猪魏氏梭菌病的诊治及体会[J]. 中国畜禽种业, 2014, 10(11):124.
- [21] 李西康. 一起种母猪魏氏梭菌病的综合防治[J]. 中国畜禽种业, 2016(8):77-79.
- [22] 高新发, 门晶晶, 刘利军, 等. 一起怀孕母猪产前“猝死”的诊断报告[J]. 畜牧兽医科技信息, 2016(2):35-36.
- [23] 李小红, 徐春萍. 猪魏氏梭菌病的诊治报告[J]. 湖北畜牧兽医, 2014, 35(03):32-33.
- [24] 王加利. 后各种猪魏氏梭菌病的诊疗[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(02):176.
- [25] 张红英, 金钺, 卢中华, 等. 家畜“猝死症”研究进展[J]. 动物医学杂志, 2004, 26(2):22-24.
- [26] 赖蕴, 刘有生, 付球珍. 猪魏氏梭菌病的诊断与防治[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2010(4):32.
- [27] 乔济友. 规模猪场魏氏梭菌病发生的原因及防治措施[J]. 福建畜牧兽医, 2015, 37(06):47-48.
- [28] 王开功, 赵建湖, 冯杰. 贵州黑山羊猝死症的流行病学调查[J]. 广东农业科学, 2002, 30(S): 9-11.
- [29] 甘昌银, 丁大伦. 仔猪梭菌性肠炎的综合防控措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(3):152.
- [30] 李德如, 罗良群, 张科雄. 猪魏氏梭菌病的诊断和防治[J]. 养猪, 2014(1):105.
- [31] 郑同剑. 猪魏氏梭菌病的诊治[J]. 山东畜牧兽医, 2006(6): 31-32.
- [32] 许崇利, 许崇波. 产气荚膜梭菌 α 毒素基因的定点突变与表达[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2):258-263.
- [33] 宫语晨, 许崇利, 钱爱东, 等. A型魏氏梭菌 α 毒素 Asp-56 基因定点突变与结构分析[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(6):1-7.
- [34] Felipe M S, Fabricio R C, Carlos E P C, et al. Vaccination with recombinant Clostridium perfringens toxoids α and β 1 promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine[J]. Vaccine, 2013, 31:4152-4155.
- [35] Zeng J, Deng G C, Wang J, et al. Potential protective immunogenicity of recombinant Clostridium perfringens α - β - β 1 fusion toxin in mice, sows and cows[J]. Vaccine, 2011, 29(33):5459-5466.
- [36] PilehchianLangroudi R, Shamsara M, Aghaiypour K. Expression of Clostridium perfringens epsilon- beta fusion toxin gene in E.coli and its immunologic studies in mouse [J]. Vaccine, 2013, 31(32):3295-3299.
- [37] 孙雨, 王晓英, 董浩, 等. 产气荚膜梭菌外毒素基因与相关疫苗的研究进展[J]. 中国草食动物科学, 2016, 36(2):58-61.

一例犬前肢肉瘤的诊断与治疗

周红蕾¹, 钱俞佳²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 江苏华创信诺医药科技有限公司, 江苏 泰州 225300)

摘要: 宠物肿瘤疾病临床发病率较高。本文主要介绍一例犬前肢肉瘤病例的诊治过程, 采用问诊、细胞学检查、X线检查、血常规及生化检查等方法对本病例进行检查诊断, 且对该犬的肉瘤进行手术切除。

关键词: 肉瘤; 诊断; 治疗

中图分类号: S858.292 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2017)06-0019-03

目前在宠物医学临床诊断中发现, 肿瘤疾病的发病率越来越高, 严重威胁到宠物的健康, 同时也给宠物主人带来了经济、感情方面的伤害。肿瘤是指不能在机体稳态机制控制下而产生的细胞过度繁殖积聚的现象, 根据新生物体的细胞特性及对机体的危害性程度, 又将肿瘤分为良性肿瘤和恶性肿瘤两大类^[1]。有资料显示, 犬发生肿瘤的平均年龄是6~12岁, 而不同部位的肿瘤, 高发的年纪也不同。

1 病例介绍

一只中华田园犬, 雄性, 十岁, 体重为22 kg。主诉: 该犬右前肢长有一个大包, 已有两年, 饮食欲及大小便皆正常, 平常不影响正常走路。最近两天发现该患处有些发热, 所以带来就诊。

2 诊断

2.1 临床常规检查

问诊: 该犬患病两年有余, 平时饮食欲正常, 大小便正常。近日患处突然发热。

视诊: 该犬精神状态不佳, 被毛粗糙, 焦虑。右前肢尺骨后端有一明显瘤状物, 体温为39.1℃。

触诊: 触压该犬右前肢桡尺骨后方肿瘤处, 该犬表现有痛感。

2.2 实验室检查

2.2.1 细胞学检查

2.2.1.1 在做采样之前先和主人做好沟通工作, 并详细告知要操作的流程及在采样过程中会出现的问题等。

2.2.1.2 观察评估动物的状态, 判断如何进行操作。

2.2.1.3 准备好采样所需的器械和材料: 显微镜, 载玻片, diff-quick染色液, 5 ml注射器。

2.2.1.4 固定采样部位, 做好肿块表面皮肤消毒工作, 并使用5 ml针管, 握住针尾进针, 感觉到肿块之后, 控制进针深度, 往回抽吸, 针头上有细胞即可, 重复3~5次, 要尽可能多的采集一些细胞。退针之前要注意先释放负压, 取下针头, 抽一管空气, 再接回针头, 拿出准备好的玻片, 将样本吹出涂抹在载玻片上, 使用diff-quick染色液进行浸染, 等到玻片干燥后放在显微镜下观察, 得到的细胞学检测结果如图1所示(图见第51页)。

2.2.2 影像检查

将患犬侧卧保定后采用X射线检查, 可见该瘤状物未侵蚀骨骼, 如图2所示(图见第51页)。

2.2.3 血常规检测

抽取该犬头静脉血进行犬全血血常规检查, 结果如表1所示。结果显示, 血液常规检查并未发现明显异常。

2.2.4 生化检查

抽取该犬头静脉血离心后进行血液生化全套

收稿日期: 2017-08-25

基金项目: 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015 C230)

作者简介: 周红蕾(1980-), 男, 汉族, 山东烟台人, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为宠物医学. E-mail: 253623710@qq.com

检查, 检查结果如表2所示。可见, 该犬各项生化指标基本处于正常范围内。

表1 血常规检查报告

检测项目	检测结果	单位	参考范围	提示
白细胞	7.15	10 ⁹ /L	6.0-17.0	--
淋巴细胞	1.6	10 ⁹ /L	0.9-5.0	--
单核细胞	0.7	10 ⁹ /L	0.3-1.5	--
粒细胞	5.0	10 ⁹ /L	3.5-12.0	--
淋巴细胞百分比	20.8	%	12.0-30.0	--
单核细胞百分比	9.1	%	3.0-10.0	--
粒细胞百分比	70.1	%	60.0-67.0	H
血红蛋白	14.2	g/dl	12.0-18.0	--
红细胞压积	38.5	%	37.0-55.0	--
红细胞	6.42	10 ⁹ /L	5.50-8.50	--
红细胞平均体积	38.5	fl	60.0-72.0	--
平均血红蛋白量	6.4	pg	19.5-25.5	--
平均血红蛋白浓度	60.0	g/dl	32.0-38.5	--
红细胞分布宽度	19.9	%	12.0-17.5	H
RDW _a	40.4	fl	35.0-53.0	--
血小板	207	10 ⁹ /L	200-500	--
平均血小板体积	7.6	fl	5.5-10.5	--

表2 血液生化报告单

检测项目	单位	结果	标准参考值	判定
总蛋白	g/L	5.4	5.2-8.2	--
白蛋白	g/L	2.7	2.2-3.9	--
球蛋白	g/L	2.4	2.5-4.5	--
丙氨酸氨基转移酶	U/L	42	10-100	--
碱性磷酸酶	U/L	50	23-212	--
淀粉酶	U/L	704	500-1500	--
总胆红素	MG/DL	0.2	0.0-0.9	--
尿素氮	MG/DL	20	7-27	--
钙	MG/DL	9	7.9-12.0	--
磷	MG/DL	2.0	2.5-6.8	↓
肌酐	MG/DL	1.2	0.5-1.8	--
葡萄糖	MG/DL	100	70-143	--

综上, 通过细胞学检查, 影像学检查, 血常规及生化检查, 初步判断该瘤状物为肉瘤。

3 手术治疗

3.1 手术动物准备

3.1.1 建立静脉给药通路(留置针)

3.1.2 麻醉前给药:皮下注射静安舒0.5 ml, 先消除动物的恐惧心理, 降低应激反应;

3.1.3 进行术部除毛, 消毒。

3.2 麻醉与保定

麻醉前用药十五分钟后, 将丙泊酚8 ml 静脉推注诱导麻醉, 然后进行气管插管。将该犬右侧卧保定于手术台上, 将患肢术部暴露。然后连接麻醉机管道, 进入吸入麻醉。

3.3 手术过程

在肿块皮肤表面做一长5~10 cm的梭形切口, 钝性分离皮肤及皮下组织直到肿瘤基部, 结扎肿瘤表面的血管, 直到将整个肿瘤与周围软组织完全分离开, 用无菌的生理盐水冲洗肿瘤基部, 最后进行皮肤的间断水平褥式缝合。手术中应该注意应尽量少的触碰肿瘤, 防止手术损伤导致后期复发。避开大血管及神经, 对于小血管可进行结扎止血。

3.4 术后护理

用无菌纱布敷料附着于伤口上, 然后自粘绷带固定患处, 防治患犬舔舐。术后抗生素抗菌消炎, 近期要注意减少运动量, 手术当日禁食。

4 讨论与分析

肿瘤的发生和宠物的年龄, 性别, 机体的免疫力有一定的关系, 犬发生肿瘤的平均年龄是6~12岁, 该病例中该患犬的年龄10岁, 属于老龄犬, 抵抗力也有所减退, 也是导致肿瘤发生的病因之一。

肿瘤是机体在内因和外因的作用下, 细胞不受机体调控, 发生了基因的改变, 从而异常增殖, 增生与分化的现象。肿瘤又分为良性肿瘤和恶性肿瘤两种。两者存在一定的差别, 治疗时要分清。良性肿瘤生长缓慢, 边界清晰, 有包膜, 常常呈膨胀型生长, 分化良好, 无明显异型性, 排列规则, 近似正常组织, 一般不侵袭不转移, 切除后不会复发, 对机体一般影响不大。然而, 恶性肿瘤恰好相反, 恶性肿瘤生长较快, 边界不清楚, 大多无包膜, 呈侵袭性生长, 分化不良, 有异型性, 排列不规则, 与正常组织差别较大, 易转移易复发, 代谢异常, 对机体影响力也比较大。恶性肿瘤是发生在上皮间叶组织的, 又称为癌, 可以采取手术及化疗结合的治疗方案^[2]。本病例中, 患犬的肿瘤已经长达两年,

表面光滑, 没有转移, 对患犬采取了手术摘除, 摘除后愈合良好。

参考文献:

- [1] 林立中, 陈金泉, 林修素. 犬猫常见肿瘤诊疗[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2014.
- [2] North S, Banks T, 陈艳云, 等. 小动物肿瘤学[M]. 中国农业科学技术出版社, 2016.

上接第15页

提高工资待遇, 招收年龄在45岁以下的工人。由于养鸡工作环境艰苦, 工作过程枯燥无味, 所以在生活区应设置免费网络和丰富的活动场所如, 乒乓球台、篮球场、棋牌室、卡拉ok间等以供工作之余可以娱乐身心的环境。这样才有可能留住有活力的年轻人, 从而保证人工授精工作的有效实施。

2.2 翻肛人员与输精人员应密切配合

人工授精需要工人有一定的技巧和经验, 并且在操作过程中应精诚合作, 配合默契。建议场长最好将夫妻或者性格合得来人员安排在一个舍饲养种鸡, 同时将受精率和工资挂钩, 促使老工人快速带会新员工, 减少管理中的矛盾。

工人操作应正确, 翻肛人员要做到: 右手抓母鸡膝关节尽量靠近腹部, 这样不易造成母鸡挣扎, 也利于腹压产生; 保定位置不要过于往外, 使母鸡的尾羽垂直笼门即可, 利于母鸡自然回笼, 缩短受精时间; 左手食指与拇指呈平行状, 在泄殖腔口的上下边缘, 且两指不要触摸输卵管, 否则造成交叉感染; 给母鸡腹部施加压力时, 一定要着力于腹部左侧。因右侧为直肠开口, 着力相反会引起母鸡排粪。输精人员应注意: 切忌将输精管斜插入输卵管, 否则易损伤管壁, 引起输卵管发炎; 及时更换输精管吸头, 最好每10只鸡更换一个吸头, 可减少交叉感染。输精时发现气泡产生、精液外溢、精液被粪便污染、输后立即产蛋的母鸡需重新输精。

2.3 稀释精液

选用合理的精液稀释液对原精液进行稀释, 不仅能够增加精液量还能确保每次均有足够剂量的精子输入, 给更多母鸡输精, 提高公鸡利用率。同时稀释后的精液精子分布更均匀, 避免精子发生凝集现象、延长精子存活时间, 从而提高受精率。另外稀释后可以减少一半公鸡的采精工作, 节省劳动力和养殖成本。

稀释精液时应按照稀释液使用说明操作, 先

将稀释液调到与精液相同的温度, 在采精后立即将稀释液沿精液杯壁缓慢加入, 然后轻微的混合均匀。切记不能将精液倒进稀释液中, 这是错误的做法。

2.4 重视公鸡管理

应将公鸡放在鸡舍的最前面, 派输精人员准确的、定时定量饲喂公鸡, 此外饲料中添加VC、VE、VAD3可以提高精液质量, 有的养殖者在饲料中加0.5%的精氨酸, 以增加射精量。

将所使用的公鸡分成优秀、可用、待用三种, 每天对公鸡做到心中有数, 并定期的称取公鸡体重, 发现体重增长不达标的及时查找原因, 使公鸡保持最佳体况。每次采精时观察公鸡精液质量和数量, 发现异常尽快采取补救措施, 避免引起受精率的下降。

2.5 定期检测公鸡精液

每月定期检测一次公鸡精液, 在400倍显微镜下仔细观察每一只公鸡的精液, 对死精的公鸡弃之不用, 将弱精的、精子较稀的、活力较好但脏的公鸡单独放在一侧笼内, 加强管理、定期采精, 等恢复后再使用。这样可以保证每次输入的精液均是优质的, 从而确保持续较高的受精率。

2.6 定期修剪公鸡尾毛

告知工人拔掉公鸡尾部羽毛的危害, 杜绝这样操作, 为了避免后腹部羽毛污染精液, 建议每10天定期修剪公鸡肛门周围的羽毛一次, 并且在剪毛前给公鸡投喂抗应激药物, 以减少剪毛给其带来的应激, 剪毛动作应仔细轻柔, 防止剪破皮肤。

3 小结

综上, 采用合理的人工授精, 不仅提高了公鸡的利用率, 降低饲料成本, 增加经济效益, 还保证了母鸡的受精率, 发挥出优良公鸡对种群的影响。因此, 笔者希望本文能为人工授精的不断优化提供实践依据。

难产豹纹守宫的麻醉与外科治疗讨论

罗声扬, 李少川*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510000)

摘要: 难产是爬行类动物常见的疾病。本文通过整理三例豹纹守宫难产诊治的详细过程, 结合相关资料与经验, 探讨、总结豹纹守宫难产的原因、鉴别诊断、麻醉、外科治疗方法以及预后情况, 为守宫难产类疾病的诊治提供参考依据。

关键词: 异宠; 难产; 外科; 麻醉

中图分类号: S858.92 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2017)06-0022-03

豹纹守宫(以下简称“守宫”)是一种卵生的小型爬行类动物。当雌性个体无法将蛋正常排出时, 则判断为发生难产。与犬猫等小动物的难产不同, 豹纹守宫难产时不会表现出强烈的努责行为和不适感, 而是会出现腹围增大、长期拒食(最长可达数月)、精神沉郁、逐渐消瘦等症状, 最终会因各种并发症而死亡。对于近期三例豹纹守宫的难产案例, 笔者曾采用过多种支持疗法或内科治疗手段, 但最终都达不到预期效果。考量过后改用外科手术摘除输卵管和滞留的蛋, 取得了较为理想的效果, 现介绍如下。

1 基本情况

病例1为1岁雌性豹纹守宫, 繁殖场饲养, 体重51克。该守宫距交配已过50天, 有难产征兆, 腹围增大, 有渗出性腹水, 精神沉郁, 不好动, 拒食, 腹泻, 有轻微脱水。

病例2为2岁雌性豹纹守宫, 单个人工饲养, 体重36克。该守宫距交配已过62天, 体型偏小, 体格消瘦, “牙签尾”, 腹围增大, 可见明显蛋的形状, 精神沉郁, 不好动, 拒食。

病例3为1岁雌性豹纹守宫, 繁殖场饲养, 体重54克。该守宫距交配已过60天, 有难产征兆, 保守治疗无果, 近日由于暴躁刨坑产卵不小心损伤腰椎背侧皮肤, 无妥善处理后感感染至脊椎, 现

后肢瘫痪无力, 伤口淤血流脓, 且右侧眼睛继发葡萄膜炎。感染后守宫精神沉郁, 食欲废绝, 腹泻。

经调查以上三只豹纹守宫都饲养在合适的环境中, 产期有给予产盒, 每天喂食大麦虫。

2 诊断

2.1 基本检查

本文三只豹纹守宫心率、呼吸无异常, 相同点是都出现了拉稀、腹泻等消化系统疾病。这些消化系统疾病是一个缓慢进程的结果, 在长期的消耗之下, 三只守宫都存在不同程度的体重下降和脱水的情况, 结合繁殖史和病史, 怀疑存在难产。当中病例3状态较差, 同时罹患多个疾病, 预后较差。

2.2 粪便检查

镜检结果: 皆未见虫卵, 未见致病菌, 有轻度菌群紊乱。

2.3 X光检查

兽医们可以使用细胞学与超声检查去鉴别诊断难产的疾病, 但操作难度相对较高, 且不一定有特异性的现象, 因此临床上习惯使用X光诊断难产疾病。

本文病例2和病例3都利用了X光确诊了难产的问题, 怀孕的个体在X光下可见浆膜腔后半段

收稿日期: 2017-08-28

作者简介: 罗声扬(1995-), 男, 兽医本科, 华南农业大学本科就读, 研究方向异宠和外科. E-mail: 932441456@qq.com

*通讯作者: 李少川(1990-), 男, 兽医师, 硕士, 主要从事外科工作. E-mail: 465688703@qq.com

被蛋占据, 蛋壳呈高密度影像, 蛋质呈软组织密度影像。通过对比蛋的短轴直径和骨盆宽度, 笔者判断滞留的蛋无法通过泄殖腔排出, 且畸形、体积过大的蛋已经压迫到邻近器官。由图1病例2的X光图可见, 蛋的短轴直径明显大于骨盆宽度(图见第51页)。

3 诊断结果

三个病例都存在难产的疾病, 且由于蛋的物理挤压作用和体内激素的作用使其他系统产生了功能障碍。且这些并发症没有被及时处理, 因此在疾病进展的过程中, 守宫的状态越来越差, 体内可能存在离子紊乱的问题, 已经不可能依靠自己的力量从泄殖腔里排出蛋, 造成了蛋的滞留。

4 治疗

4.1 术前准备

术前用药: 所有病例皮下注射乳酸林格: 生理盐水: 5%葡萄糖溶液=1:1:1的复合溶液0.6 ml以补充体液, 口服美洛昔康0.2 mg/kg。病例3术前使用抗生素恩诺沙星5 mg/kg。

术前诱导麻醉: 将守宫置于密闭的小箱子中, 底下铺加热垫保持温度在28~30℃左右, 该温度要维持整场手术。随后先往箱子内通5~10 min纯氧, 目的是稳定动物状态, 然后再通入5%异氟烷直至守宫足够镇静到可以打开口腔为止。

插管和麻醉: 轻轻打开守宫口腔, 找到位于舌根末端的气管开口, 用24 G留置针的软管充当气管插管, 插管完成后连接气体麻醉机, 用2%异氟烷维持麻醉, 用呼吸机维持正压呼吸(见图2, 图见第52页)。

麻醉监护: 豹纹守宫麻醉后, 使用多普勒仪监测心率, 监测部位通常是心脏或颈静脉, 同时每五分钟记录一次呼吸速度, 注意在打开体腔后或者守宫停止呼吸时需要给予正压呼吸。豹纹守宫呼吸和心率的正常值暂无相关研究, 因此可以对比术前的心率呼吸数值来粗略评判动物的状态。爬行类动物在麻醉后呼吸可能会降低到很低的数值, 如过低时需要正压通气保持5~10次/min的呼吸速率。脉搏血压计可以用于检查心率和血氧饱和度, 建议使用直肠内探头检测。此外, 反射消

失可以评估麻醉的深度, 豹纹守宫常用于评估的反射有掐指反射、翻正反射、眼睑反射和瞳孔反射。通常眼睑反射消失表示麻醉深度合适或过深^[1]。

4.2 手术过程

守宫输卵管摘除术最好使用较小的眼科器械进行, 操作介绍如下: 守宫作仰躺保定, 用纸胶带固定四肢, 气管插管, 同时固定多普勒仪监护心率(见图2), 消毒铺创巾后开始手术。透过皮肤观察蛋的位置, 用食指和拇指固定住较大的一侧蛋, 皮肤切口开始于蛋的正上方, 长度约1~2 cm。这样做的目的是避开位于腹中线的腹中静脉。切开皮肤后适度分离皮下组织, 随后提起蛋的正上方肌肉, 用手术剪剪开, 暴露体腔。暴露体腔后, 通常可观察骨盆附近两块对称存在的脂肪, 如果阻碍视野亦可将其拉出体外, 手术结束后复位。操作时, 注意避开位于腹中央的腹中静脉, 随后将输卵管拉出体外, 施行结扎术, 摘除该段输卵管及滞留的蛋, 同时结扎两端输卵管。由图3所示(图见第52页), 将输卵管拉出体外, 可见视野中央左侧为滞留的蛋, 右侧有少量干酪样渗出物。在笔者经验中, 难产守宫通常伴发原因不明的浆膜腔炎, 如果在术中发现难产守宫体腔内有黄白色干酪样渗出物(脓包), 应该实施腹腔冲洗术尽量将脓块清出, 随后无菌关闭腹腔。爬行类动物皮肤通常有角质化的鳞片, 因此皮肤需要采用外翻缝合^[2]。

4.3 术后苏醒和护理

麻醉苏醒: 缝合皮肤后, 先不要拔出气管插管, 应缓慢降低正压呼吸频率和氧浓度, 增加二氧化碳浓度刺激呼吸, 等到观察到守宫有自主呼吸后再通3~5分钟氧气后方可拔出气管插管。适当的提高温度有利于守宫代谢, 加快麻醉苏醒。术后守宫应该补充体液, 按上文介绍的配方皮下补液0.6 ml/day, 可根据失血量增加补液的量但不能超过1.5 ml/day。(通常每日维持量为10~30 ml/kg)口服拜有利0.25 mg/kg/day, 口服美洛昔康0.2 mg/kg/day, 连用三天。术后每天可以在伤口处涂抹抗生素软膏防止感染。术后守宫等待麻醉苏醒以及巨型蛋, 皮肤需要外翻缝合见图4(图见第52页)。

5 讨论

现阶段导致爬行类动物的难产的原因尚未明确, 有学者认为是与怀孕期营养过剩、缺钙、饲养环境没满足产卵要求和某些内科疾病有关。如果是高产的物种, 那么生产时间过久可能会导致产力不足而发生难产。对于临床兽医师而言, 在遇到难产的案例时首先要改善生产的环境和给予营养补给, 这是开展其他治疗的一个基础条件。如果是较大型的爬行类动物则可以考虑验血检查, 评判动物血钙浓度、肝肾功能和白细胞水平, 有利于更好的发现病因和评估预后, 但只针对对于难产而言, X光检查是最好的确诊手段。

各种爬行类动物的麻醉互相相似, 但各不相同, 习惯上主要分为龟类、蛇类和蜥蜴三大类, 本文主要介绍蜥蜴的麻醉。在麻醉前, 尽可能的给虚弱的动物放置静脉留置针或骨内留置针, 在术前、术中、术后都可以根据动物的状态补充体液、抗生素治疗以及营养支持。尽管没有确切的研究, 但多数的异宠医生都认为, 麻醉前应该给予阿片类止痛药或者非类固醇类抗炎药提供止痛效果。笔者习惯使用美洛昔康, 安全剂量为 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ ^[3]。本文介绍的物种豹纹守宫体重只有50 g左右, 无法进行血液检查评估肝肾功能, 因此没有选择诱导麻醉药物, 而是直接通过异氟烷镇静与麻醉。另一方面, 该手术的手术时间较短, 但爬行类动物代谢镇静药和诱导麻醉药的时间却很长, 直接使用异氟烷镇静与麻醉会使动物苏醒更快, 降低了麻醉风险。爬行类动物在麻醉过程可能会发生闭气的现象, 在龟身上尤为常见, 一旦发生了闭气现象应给予正压呼吸。由于爬行类动物没有膈肌, 它们没有胸腹腔的分隔, 只要打开体腔后就无法自主呼吸, 这时也需要给予正压呼吸。现阶段对于豹纹守宫的潮气量没有一个很好的研究, 因此安全起见笔者习惯通过缓慢增加通气量使豹纹守宫的胸部起伏, 直到接近其自然起伏状态为止, 呼吸频率 $5 \sim 10 \text{ 次/min}$ 为宜^[4]。

在进行爬行类的手术之前, 术者应熟悉该动物的解剖特性。豹纹守宫没有子宫结构, 施行输

卵管结扎术后即无法生殖, 杜绝了许多生殖系统疾病。在手术中要尽量避免损伤血管, 一只小型蜥蜴可承受的最大安全失血量仅为 $0.25 \text{ ml}/100 \text{ g}$, 出血可能会导致术中低血容, 预后不良。豹纹守宫通常术后12小时便可以喂食, $7 \sim 10$ 天左右拆除皮肤缝线。

部分雌性爬行类动物会在发情期排出许多的卵泡, 这些卵泡占据了大量的体腔体积, 同压迫到体腔中的其他器官。事实上, 发情或怀孕期间, 在激素和物理压迫的作用下, 爬行类动物即使不发生难产, 也会出现一些消化系统疾病的症状。而爬行类动物一旦拒食, 便容易继发肝肾的问题。笔者文中介绍的三个病例都在术后很短时间内恢复食欲, 且在一些病例的记录中, 产期拒食的龟类在排出卵后同样是很快的重新进食。所以笔者猜测, 蛋的机械压迫是导致爬行类动物产生其他系统功能障碍的主要原因。关于造成难产的原因, 有学者认为, 豹纹守宫在排卵期营养过剩, 导致蛋过度发育是造成难产的主要原因, 笔者对饲养主饲养方法的调查结果也同样的佐证了这个观点, 但深入的致病机理还在研究当中。虽然致病机理尚不明确, 但临床兽医师仍然需要教育宠物主以正确的饲养方式去饲养爬行类动物, 因为绝大部分的爬行类动物疾病都是饲养管理不当造成的。针对难产来说, 要制定合理喂食方案防止过度肥胖, 在日常饮食当中需要定期添加钙粉和维生素。在发情期和繁殖期需要多留意爬行类动物的状态, 及早放置产盒以及做好备产工作可以有效的降低难产的风险。

参考文献:

- [1] Mitchell M A 以及 Tully T N Jr. 著, 林媵媵、蔡伊婷等译, 董光中审阅. 野生动物临床入门-外温动物[M]. Taipei Taiwan: ELSEVIER Inc, 2016:98-147.
- [2] Mader D R. Reptile medicine and surgery [M]. St. Louis, Missouri: ELSEVIER Inc, 2006:344-441, 1391-1398.
- [3] Carpenter J W. Exotic animal formulary [M]. St. Louis, Missouri: ELSEVIER Inc, 2013:173.
- [4] Longley L A. Anaesthesia of Exotic Pet[M]. St. Louis, Missouri: ELSEVIER Inc, 2006:185-208, 211-218.

双侧肾切开手术对健康犬肾功能的影响

林贤康¹, 关钰澄¹, 卢艺¹, 吴颖瑶¹, 梁凯欣¹, 陈义洲^{*1, 2}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:为了评估双侧镰刀状肾切开手术对肾小球滤过率(GFR)的影响, 本研究评估了5只健康犬在双侧镰刀状肾切开后的功能变化。术前对动物的肾脏进行了肾脏功能的实验室检查, 包括全血细胞计数、肾功能血清生化检查超声检查以及利用内源性肌酐清除率对肾脏肾小球滤过率进行检查。在双侧肾切开后, 再第1、2、3、7、14、28天跟踪所有的血液检查, 在第7、14、28、48天跟踪内源性肌酐清除率变化。在术后第二个月对单侧肾脏进行组织病理学检查, 并对肾伤口愈合的损伤严重程度进行量化评分。对数据进行t检验以判断变化的显著性。结果发现, 术后一个月内血液学检查与血清生化检查均无明显的异常。术后2周内有明显的血尿, 相应的内源性肌酐清除率在术后第七天上升了18.1%, 但在术后十四天内以及之后迅速恢复到正常。组织学检查见轻微到中度的皮质髓质纤维增生与纤维化(1.167±0.408)。实验结果显示, 对健康犬实施双侧肾切开手术对肾脏结构无明显的影响, 术后肾功能指标在短期内出现轻微上升, 但很快就恢复正常。

关键词:犬; 双侧肾切开; 病理组织学检查; 肾小球滤过率

中图分类号:S858.292 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2017)06-0025-04

肾切开术常用于肾盂结石的去除以及探查肾盂肿瘤或对尿血症进行排查^[1]。犬肾和输尿管的结石占泌尿道结石的5~10%, 其治疗方法包括内科的溶石治疗, 外科的肾切开放石以及超声波体外碎石等。内科治疗主要目的是通过药物治疗肾结石引起的肾功能不全以及对结石进行溶解后排出。但动物因结石而引起的阻塞不能采用药物治疗, 同时大部分尿结石(如草酸钙、磷酸钙、硅酸盐结石和混合成分结石)药物溶解是无效的^[2]。超声波体外碎石是人类医学治疗肾结石常用的方法, 虽然早在1999年国外已经有体外碎石成功治疗犬肾结石的报道^[1], 但由于受到仪器设备的限制, 目前此方法尚未在国内外兽医临床上广泛使用。肾切开术取出结石可以迅速达到去除结石的目的, 但肾切开后对不同疾病状态下动物的肾功能的影响如何, 目前还存在争论, 一些研究认为

通过肾切开术取出非感染性结石对肾脏造成的损伤可能比结石本身对肾的损伤更大^[1], 而另一些研究则认为在结石早期进行肾切开术所带来的风险, 要比保守内科治疗后可能的结石性堵塞所造成的肾损伤要轻得多。相关研究表明, 肾镰刀状切开后6周, 肾小球滤过率(GFR)可降低20~40%^[2]。有学者曾对单侧肾切开后对肾功能的影响进行研究, 发现术后肌酐、尿素氮等肾功能指标出现明显升高, 但在1个月内恢复正常, 结果表明单侧肾切开术治疗犬肾结石的方法在临床操作中具有可行性^[3]。而也有一些研究建议, 双侧肾结石时采用肾切开放石, 两个肾之间相隔4~6周^[4]。为了探讨双肾切开术对健康犬肾功能的影响, 本实验通过对5只实验犬进行双肾切开术, 观察术后肾功能的变化, 分析手术对犬肾功能的影响, 为临床上治疗犬双肾结石提供理论依据。

收稿日期:2017-11-07

基金项目:国家级创新训练项目(201610564123)

作者简介:林贤康, 男, 本科在读, 专业方向为小动物疾病防治. E-mail: felixlxk@hotmail.com

*通讯作者: 陈义洲(1977-), 男, 高级兽医师, 博士, 主要从事宠物疾病及寄生虫病研究. E-mail: ofloxacin@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

混种犬5只, 随机编号, 年龄为8个月至1岁, 性别不限, 体重在8~12 kg, 术前正常体检均表现为临床健康, 用商品化犬粮适应性饲养一个月。

1.2 实验方法

1.2.1 血液检查

分别在术前1天、术后第1、2、3、7、14、28天进行血常规和肾功能血清生化检查(肌酐BUN、尿素氮CREA、与磷P)。

1.2.2 尿液检查

术前1天、术后第1、3、7、14天采集犬的随机中段尿液, 并对尿液进行尿常规十项检测、尿沉渣检查以及尿蛋白肌酐比值(UPC)检查。

1.2.3 B超检查

在术前1天、术后第7、14天对犬双侧肾脏进行B超扫查, 评估手术前后肾脏实质的回声变化已经术后肾脏大小变化。

1.2.4 内源性肌酐清除率检查

分别在术前第1天、术后第7、14、28、48天进行内源性肌酐清除率检测。在检查开始前给犬留置双腔导尿管与2 L尿袋, 收集24小时尿液, 记录尿量与犬体重, 分别测定血清和尿的肌酐浓度。

1.2.5 组织学检查

在术后第8周麻醉后开腹, 分别摘取五只实验犬的左肾进行病理组织学检查, 根据组织学变化评估肾脏的损伤程度, 采用0~4分的打分制(0分表示无损伤;1分表示出现轻微损伤;2分为中度损伤;3分为显著损伤;4分为严重损伤)。评估的病变类型包括皮质、髓质梗死与变性;纤维增生与纤维化;炎性变化以及钙化。此外, 肾脏内的出血程度也通过0~4分的打分制进行评估(0分表示无出血;1分表示出现轻微出血, $\leq 5 \text{ mm}^2$;2分为中度出血, $6 \sim 20 \text{ mm}^2$;3分为显著出血, $21 \sim 40 \text{ mm}^2$;4分为严重出血, $\geq 41 \text{ mm}^2$)^[2]。

1.2.6 手术方法

术前禁食禁水8小时, 常规术前用药, 丙泊酚诱导麻醉, 异氟烷维持麻醉。腹中线常规开腹, 暴露左肾和右肾, 在肾大弯处分离被膜, 用手指和湿润的纱布轻柔地将肾被膜剥下, 分离显

现肾动静脉后, 用动脉夹夹住肾动脉, 然后用无菌冰块对肾脏进行降温以减少肾脏代谢损伤。用手术刀从肾脏凸面纵向沿矢状面切开皮质和髓质部直至肾盂处, 建立肾切开模型。然后用3-0可吸收缝合线连续缝合肾被膜和少量肾皮质, 松开动脉夹, 取走冰块后观察肾脏出血情况。用同样的方法切开另一侧肾脏。术后常规关闭腹腔, 并对实验犬进行常规术后护理。

1.2.7 数据分析

对每一个肾脏术前与术后的GFR变化、肾脏之间的病理组织学变化、肾脏大小的变化进行*t*检验。

2 结果与分析

2.1 血液检查

4号和5号犬在术后第一天白细胞为 $31.4 \times 10^9/\text{L}$ 与 $36.4 \times 10^9/\text{L}$, 术后第三天恢复正常。术后1、2、3号犬血常规检查未见异常。

血清生化检查显示所有实验犬血清肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、磷(PHOS)在术后第1~3天内表现逐步升高的趋势(但仍在正常参考范围内), 之后逐渐下降到术前水平(见图1)。

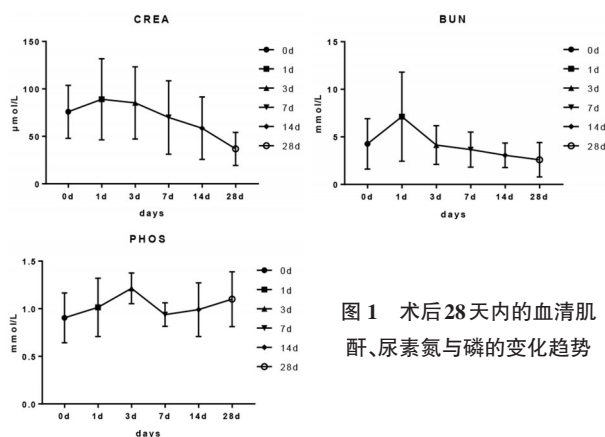


图1 术后28天内的血清肌酐、尿素氮与磷的变化趋势

2.2 尿液检查

术前尿液物理性质检查未见异常。术后第一天, 所有实验犬尿液均呈鲜红色, 有血腥味, 较浑浊, 离心后上层液体黄色透明, 有较多的红色沉渣。术后第三天, 所有实验犬尿液呈稻草色, 透明, 离心后可见少量红色沉渣;术后第七天所有实验犬尿液呈稻草色, 透明, 离心后未见沉渣。

术后第一天平均尿比重轻微上升, 但与术前相比并无显著差异(t 检验, $P=0.2835$), 且均在正常范围内, 表明肾脏的重吸收与尿液浓缩功并未受到太大的影响。

在术前、术后第1、3、7、14天分别对5只犬的随机中段尿进行尿十项检查。术前所有犬尿十项检查未见异常, 在术后全部犬均出现血尿, 持续的时间为7~14天, 期间血尿的程度逐渐减轻, 由于实验犬术后出现血尿, 血尿的颜色及成分对尿液蛋白质检测存在较大影响。术前五只犬均为尿液蛋白质检测存在较大影响。术前五只犬均为尿液蛋白质阴性, 术后第一天上升至 55 ± 41.533 g/L, 第三天下降45.5%至 30.0 ± 0.0 g/L, 并随着时间逐渐降低, 第14天下降至 12.0 ± 16.432 g/L(见图2)。

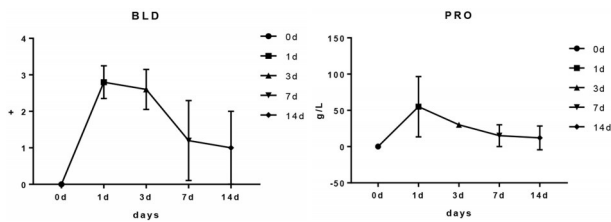


图2 术后14天内的尿液潜血(BLD)与尿液蛋白(PRO)变化

术前尿沉渣检查未见异常。术后第一天尿沉渣物镜检可见大量红细胞, 约100个/100×视野, 偶见膀胱上皮细胞和透明管型, 未见微生物病原体; 术后第三天, 尿沉渣数量变少, 镜检可见多量红细胞, 数量降至约20个/100×视野, 偶见膀胱上皮细胞和透明管型, 未见微生物病原体(见图3, 图见第52页)。术后第14天, 尿液恢复正常颜色, 尿沉渣镜检未见明显的细胞、管型、结晶和微生物病原体。

2.3 B超检查

术前与术后的B超检查并未见明显的结构与回声性质变化。

2.4 内源性肌酐清除率

肾脏切开后机体血压降低, 肾脏血流量降低, 通过肾脏自身调节, 使入球小动脉扩张, 肾小球系膜扩张, 升高肾小球净水压和肾脏清除率。个体上, 除5号犬外, 其余犬术后第7天肌酐清除率升高, 4号犬升高至5以上, 随后恢复至与术前相近水平, 5号犬肌酐清除率相对稳定。术后第7天, CCr相对于术前基础值上升了18.1%, 术前与术后第7天的CCr

有显著差异(t 检验, $P=0.0363$), 但术后14 d、28 d、48 d的CCr与术前的相比均无显著差异性(t 检验, P 分别为0.5491、0.8890、0.5962)(见表1, 图4)。

表1 术前与术后的内源性肌酐清除率(CCr)变化 (ml/min/kg)

犬	术前0 d	术后7 d	术后14 d	术后28 d	术后48 d
1号犬	3.76	4.65	3.64	3.85	3.88
2号犬	2.53	3.05	2.76	2.64	2.71
3号犬	4.11	4.79	4.08	4.23	4.16
4号犬	4.15	5.25	3.99	3.85	3.76
5号犬	2.61	2.53	2.45	2.53	2.32
平均值	3.432	4.054	3.384	3.42	3.366
标准差	0.8019	1.189	0.7381	0.7788	0.8022

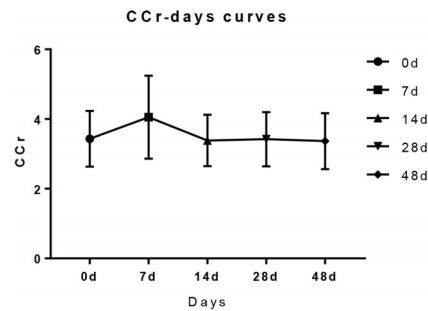


图4 术后48天内的内源性肌酐清除率变化

2.5 组织病理学检查

在术后第58天摘取5只犬的左肾进行组织学检查, 均未见有明显的出血(0.333 ± 0.516), 但在皮质与髓质靠近切口处纤维化部分的区域可见扩张的血管以及少量的含铁血黄素。肾脏皮质轻度至中度梗死和变性(0.667 ± 0.516), 以肾小管上皮细胞内玻璃样变性为主。所有实验犬肾脏髓质均无梗死表现, 髓质轻微变性(0.167 ± 0.408)。皮质与髓质表现为轻度到中度的纤维化(1.167 ± 0.408), 以切口附近的纤维增生最明显, 皮质纤维化最宽的达0.47 mm, 最窄的仅为0.99 mm, 皮质的纤维增生要较髓质的多, 但皮质中纤维增生部位的肾小球的数量与体积并未受到纤维增生的明显影响。所有的肾脏样本中均未见明显的炎性变化与钙化(见图5, 6, 图见第52页)。

3 讨论

在本次实验中,通过对GFR以及血清肌酐和尿素氮浓度的测定发现,肾脏功能在双侧肾切开之后所受到的影响较为轻微。除了术后有轻微上升外(术后七天内的GFR水平仍在正常范围内),术后2周内GFR就恢复到了术前的基础水平。Gahring曾报道肾切开会导致20%到40%的肾功能损失,在该研究中,肾脏功能的损伤在第三周时达到最大,在第六周的时候出现了一定程度的恢复^[6],但在本实验中肾脏功能的损伤较Gahring的研究严重。在另一项研究中,Fitzpatrick报道GFR在肾切开的48小时后相对于对照基础值降低了30%到50%^[7]。Elizabeth等人报道GFR在肾切开后的第3天相对于对照基础值上升了76%,但在第7、14、28天GFR回落到原来水平且与基础值无显著差异^[2]。

本实验的结果与Elizabeth等人研究相一致,与Gahring和Fitzpatrick的研究不一致,这可能与相关实验采用的麻醉方法不同有关。在Fitzpatrick的研究中,其采用的是硫喷妥钠诱导麻醉并呼吸室内空气。单独使用硫喷妥钠对于肾脏血流并无影响,但随着动脉出血,肾脏血流的自主调节能力会变差,且对于系统性低血压更敏感。硫喷妥钠可能会通过影响系统性血压从而降低肾脏血流并影响到GFR,具体程度取决于肾切开术中的动脉出血量。而在Elizabeth的研究中,其麻醉方案为氟烷维持,供应纯氧,且在钳闭肾脏动脉之前使用甘露醇灌注肾脏。有实验表明在正常血容量的犬中,氟烷麻醉超过120分钟都不会出现显著的肾脏血流改变,甚至在平均动脉压与心输出下降的时候都不会改变肾脏血流^[2, 8]。

本实验采用的麻醉方案为丙泊酚诱导与异氟烷维持麻醉。丙泊酚不会对犬的肾脏血流或GFR有明显的改变,是肾脏疾病动物首选的诱导药物之一^[9]。异氟烷对于肾脏疾病也比较安全,只有约0.2%的异氟烷通过肾脏代谢,在肾脏所释放的无机氟离子的量也十分低,其对肾脏的细胞毒性和血流的影响十分低^[9]。国内大部分动物医院目前早已减少使用或不再使用静脉麻醉剂(如硫喷妥钠、苯巴比妥、舒泰)来全程诱导和维持,而开始普及丙泊酚诱导与异氟烷/七氟烷维持麻醉。本实验中,除了采用对肾脏影响较低的异氟烷麻醉方案外,在肾切开的过程中还采用原位降温法,有助

于减少肾脏代谢,降低由于肾脏缺氧造成的急性肾脏损伤与梗死^[10]。

实验结果显示,除了个别犬术后出现暂时性的白细胞上升外,大部分实验犬并无显著的异常,这也说明在实验过程中遵循了良好的无菌操作。肾切开手术中,手术时间越短、出血越少、越良好的无菌操作均有利于维持动物机体正常的循环,避免低血容量、感染等因素对肾脏功能带来的二次伤害。

肌酐是一种来源于肌酸和磷酸肌酸降解的小分子产物,大部分由肾小球滤过排出,肾小管的重吸收或排泄不显著,故肌酐的清除情况可一定程度上反映GFR水平^[11]。GFR是评价肾功能最佳指标,可通过测量血肌酐来间接反映肾功能。当血肌酐和GFR单独测量时,其关系可用双曲线、指数或者曲线来解释,可知通过测量血肌酐无法较好的反映早期或轻度肾功能的下降(见图7)^[11]。临床上,只有在肾损伤达到75%以上才会出现显著的肌酐浓度变化。本实验术后未出现血清肌酐显著上升的情况,表明双侧肾切开术对于肾功能的影响较轻,不会引起严重的急性或慢性肾功能衰竭,即肾损伤远低于75%。

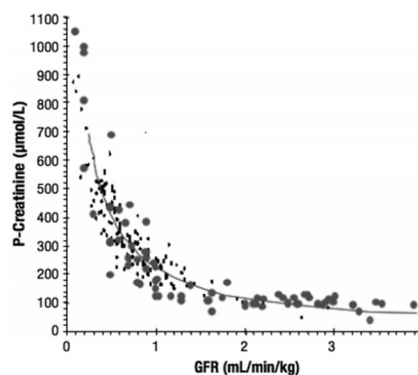


图7 肾小球滤过率-血清肌酐浓度曲线^[11]

内源性肌酐清除率(CCr)可以通过测量自身尿液和血浆的肌酐浓度,来评估肾小球滤过率(GFR),虽然目前临床研究中使用菊粉检测肾脏清除率视为金标准,但考虑菊粉测试在临床中应用的难度,一般只限于实验室研究使用。本实验中,在术后48天内五次CCr检查中,只有第七天左右的CCr出现了18.1%的上升,CCr在这短期内的上升可能是因为短

亚临界 R134a 中酶催化酯化法制取叶黄素二乙酸酯的研究

吴秀丽¹, 李辉¹, 林劲冬¹, 夏祖枫¹, 许雪磊¹, 丁宏标², 陶正国^{1*}

(1. 广州立达尔生物科技股份有限公司, 广东 广州 510633;

2. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 海淀 100081)

摘要:本文采用高效液相色谱、液相色谱-质谱联用等分析技术, 研究了南极假丝酵母脂肪酶 B 催化叶黄素与乙酸或乙酸酐在亚临界 R134a 介质中制备叶黄素二乙酸酯的反应转化率。在 250 ml 高压磁力搅拌反应器中, 0.002 mol (1.14 g) 高纯度叶黄素分别与 0.02 mol 冰乙酸和 0.02 mol 乙酸酐 (1:10 mol:mol) 在 1.14 g 大孔丙烯酸树脂固定的南极假丝酵母脂肪酶 B (Novozym 435) 的催化下进行酯化反应。在试验范围内, 乙酸和乙酸酐均在 40 ℃、10 MPa、6 h 的条件下获得最大的二酯转化率, 乙酸酐对叶黄素的最大转化率为 94.9%, 明显高于乙酸对叶黄素的最大转化率 73.9%。(结论)研究表明:亚临界 R134a 流体是脂肪酶催化叶黄素酯化反应的适合介质, 乙酸酐是叶黄素在亚临界 R134a 中酯化制备叶黄素二乙酸酯的理想酯化剂。

关键词:叶黄素二乙酸酯; R134a; 酶催化酯化; 南极假丝酵母脂肪酶 B

中图分类号:S816.32 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2017)06-0029-08

The study on enzymatic esterification of lutein diacetate in subcritical R134a

Wu Xiuli¹, Li Hui¹, Lin Jindong¹, Xia Zufeng¹, Xu Xuelei¹, Ding Hongbiao¹, Tao Zhengguo^{1*}

(¹Guangzhou Leader Biotechnology Co., Ltd. Guangzhou, 510633, China;

²Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: HPLC and LC-MS were used in this study for investigating the conversion rate of lutein esterification with acetic acid or acetic anhydride, which is catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in subcritical 1, 1, 1, 2-Tetrafluoroethane (R134a). In a 250 ml high pressure magnetic stirring reactor, 0.002 mol (1.14 g) purified lutein reacts with 0.02 mol acetic acid or 0.02 mol acetic anhydride (1:10 n/n), respectively, in the presence of 1.14g *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) stabilized by macroporous acrylic resin. Within the test range, both acetic acid and acetic anhydride can obtain the maximum conversion rate on the condition of 40 ℃, 10 MPa and 6 h. The enzymatic esterification react with acetic anhydride reach a maximum conversion rate of 94.9%, strongly higher than the conversion rate 73.9% in which using acetic acid as esterify agent. According to this research, subcritical fluid R134a could be regarded as a proper medium for enzymatic esterification of lutein while acetic anhydride is an ideal esterify agent.

Keywords: Lutein diacetate; R134a; Enzymatic Esterification; *Candida antarctica* lipase B

收稿日期:2017-10-30

基金项目:广东省科技发展专项资金(2016B090918056);广州市产学研协同创新重大专项(201604020123)

作者简介:吴秀丽(1983-01-22),女,广东佛山人,硕士研究生,主要从事功能性饲料添加剂产品的研发. E-mail:354723006@qq.com

*通讯作者:陶正国(1967-),男,安徽枞阳人,硕士研究生,兽医师,主要从事饲料添加剂研究. E-mail:ttaaaoo888@sina.com

叶黄素是含氧类胡萝卜素的总称, 主要包括黄体素、玉米黄质、辣椒红素、辣椒玉红素、虾青素等, 有着重要的保健和营养价值, 被广泛应用到饲料和食品中。

万寿菊是目前世界上食用及饲用黄体素的重要来源。从万寿菊花朵中提取的天然叶黄素酯皆为饱和脂肪酸酯, 分别是单肉豆蔻酸酯、单棕榈酸酯、单硬脂酸酯、月桂酸-肉豆蔻酸酯、二肉豆蔻酸酯、肉豆蔻酸-棕榈酸酯、二棕榈酸酯、棕榈酸-硬脂酸酯和二硬脂酸酯等^[1]。研究显示: 在禽类体内游离态叶黄素比以长链脂肪酸酯的形式存在的叶黄素衍生物具有更高的生物利用度^[2]。游离叶黄素的生物利用度虽然较高, 但是其光热稳定性却远远不如天然叶黄素酯^[3]。稳定性低大大限制了叶黄素的应用范围, 为了提高稳定性, 常常需要将其制成各种含有抗氧化剂和包覆剂的制剂, 而这些添加物不同程度地影响了叶黄素本身的吸收和利用。为此, 人们开始探寻在稳定程度和生物利用度上能有所兼顾的叶黄素形式。

Cordona 等^[4]使用短链羧酸与游离叶黄素进行酸催化酯化反应, 获得黄体素、辣椒红素等叶黄素类化合物的短链 (C1-C12) 脂肪酸酯。据称, 由短碳链脂肪酸形成的叶黄素酯比其自然形态下的长链脂肪酸酯具有更高的生物利用度, 同时, 还具有比游离态叶黄素好得多的稳定性^[5]。叶黄素转化为短链脂肪酸酯除了能够大大提高储存稳定性, 又具有明显优于天然叶黄素长链脂肪酸酯的生物利用度, 尤其适合禽类、水产鱼虾的着色^[2]。然而, 现有工业上制造叶黄素乙酸酯的方法是化学合成法。化学法合成叶黄素脂肪酸酯的过程, 通常需要用到的酰氯、酸酐、浓硫酸、有机碱等有害物质, 并且反应温度较高, 而且涉及到反应分水、产物分离与纯化等一系列繁琐的工艺过程。这些过程既容易造成叶黄素的降解损耗, 又消耗能量并污染环境。在这种背景下, 反应条件温和且环境友好的脂肪酶催化短链脂肪酸酯化叶黄素的反应体系受到了重视。

脂肪酶的系统名称是酰基甘油水解酶, 广泛存在于原核生物和真核生物。虽然脂肪酶的天然底物是甘油酯类, 但是研究表明, 脂肪酶除了能够催化甘油酯类化合物的水解与合成外, 还可以用于催化酯交换反应和其它类型酯的水解与合

成^[4]。在水解与酯化的化学平衡中, 脂肪酶在水性介质里倾向于催化水解, 而在非水体系中, 则倾向于促进酯化反应^[5-12]。大量非水环境下的脂肪酶催化酯化的研究工作集中在传统的有机溶剂中进行。辛嘉英^[13]等人研究了多种来源脂肪酶在有机相和无溶剂反应体系中催化阿魏酸与油酸甘油酯酯交换的反应, 固定化脂肪酶 Novozym435 表现出十分突出的催化效能。王子田^[14]等人研究了另一源自 *thermomycetes lanuginose* 的固定化酶 Lipozyme TL IM 在溶剂中催化单甘酯与油酸进行酯化反应, 发现 1, 3-甘油二酯产率可高达 92%, 且酶经过多次重复使用, 酶的活度和产率没有明显下降。总体上, 有机溶剂中进行的酶催化酯化反应时间较长, 产物分离步骤繁琐。与之相比, 超临界或亚临界溶剂中进行的酶催化酯化反应体系在产物分离和溶剂回收方面具有明显的优势。亚临界是指流体的压力、温度两项工艺参数之一处在临界点之上, 另一参数处在临界点之下的状态。其中, R134a 是一种对大气臭氧层无破坏性的新型亚临界溶剂, 化学名为 1, 1, 1, 2-四氟乙烷, 其临界温度为 101.1 °C, 临界压力为 4.07 MPa。亚临界 R134a 的操作压力远低于超临界二氧化碳 (临界压力 7.15 MPa)。并且, 亚临界 R134a 的溶解能力远高于超临界二氧化碳, 对醇、酸、酯有较高的溶解能力。R134a 作为酶催化酯化的反应介质, 在反应结束后通过降压即可与反应物分离, 利于重复使用, 实现绿色的生产过程。于刚^[15]等人采用亚临界 R134a 作为固定化脂肪酶 Novozym435 催化合成多不饱和脂肪酸甘油酯的反应介质, 在优化的工艺条件下酯化率可高达 84.1%。

目前, 尚未见有亚临界 R134a 介质中以脂肪酶催化叶黄素与乙酸或乙酸酐反应制备叶黄素二乙酸酯的研究报道。本试验选用固定于大孔丙烯酸树脂的南极假丝酵母脂肪酶 B 商品制剂 Novozym435 为催化剂, 在高压反应装置中进行了高纯度叶黄素 (黄体素) 与乙酸及乙酸酐在不同温度、压力条件下以固定的反应底物、催化剂比率, 在亚临界 R134a 介质中制备叶黄素二乙酸酯的反应, 通过高效液相色谱、液相色谱-正离子电喷雾电离质谱等分析技术, 研究了在亚临界 R134a 中南极假丝酵母脂肪酶 B 催化叶黄素与乙酸及乙酸

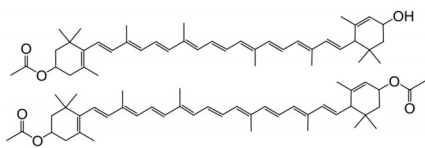


图1 叶黄素单乙酸酯和叶黄素二乙酸酯的分子结构

酰酯化制备叶黄素二乙酸酯的转化率。

1 实验部分

1.1 主要仪器与设备

ATY124电子分析天平, LC-20A高效液相色谱(HPLC), LCMS8030液质联用仪(LC-MS), 日本岛津公司。C30 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, YMC公司。BILON-MA-707型低温恒温制冷机(反应浴), 北京比朗实验设备有限公司。2J-X16型柱塞平流泵, 浙江爱力浦科技股份有限公司。GS-0.25L型高压反应釜, 威海市正威机械设备有限公司。LL-100型超声波单点液位探测器, 美国MEAS。G447-7.5/5-50型隔膜压缩机, 北京汇知机电设备有限公司。亚临界R134a反应装置, 自行组装(图1)。RE-5205旋转蒸发器, 上海亚生化设备有限公司。SHZ-82A恒温振荡器, 常州国华电器有限公司。

1.2 试验原料

叶黄素晶体, 黄体素含量83.2%, 玉米黄质含量8.2%, 由佛山立达尔生物科技有限公司提供。R134a (1, 1, 1, 2-四氟乙烷Solkane 134a), 医药级, 购自德国苏威氟化学有限公司。叶黄素标准品(50 mg, 纯度≥98%)、全反式-β-阿朴-8'-胡萝卜素标准品(1 g, 纯度≥96%), 购自美国Sigma公司。冰乙酸、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、甲苯、无水乙醇、异丙醇、硫酸钠、甲醇、氢氧化钠, 分析纯, 广州试剂厂。蒸馏水, 实验室自制。苏丹I号, 纯度98%, 上海阿拉丁生化试剂有限公司。固定化脂肪酶Novozym 435, 诺维信(中国)生物技术有限公司。柱层析硅胶, 500-800目, 试剂级, 青岛海洋化工厂。橄榄油, 聚乙烯醇124(PVA), 国药集团化学试剂公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 叶黄素的纯化

1.3.1 洗脱液配制

参照Li等^[16]研究色谱分离纯化叶黄素所使用

的流动相, 以正己烷、乙醇和水按照4:3:1的比例配制洗脱液16 kg, 使用前超声波震荡10 min。

1.3.2 色谱法分离制备高纯度叶黄素

在自制的制备色谱系统中以叶黄素晶体为原料分离制取高纯度叶黄素。称取5.0 g叶黄素晶体溶于150 ml正己烷中, 超声震荡10 min确保分散, 然后将此溶液与50 g硅胶混合均匀, 压入加料柱。将加料柱与填满500~800目硅胶的色谱柱(φ25 mm×1000 mm石英玻璃柱)连接并密封。以50 ml/min流速经加料柱向色谱柱连续泵入正己烷-乙醇-水(4:3:1)洗脱剂进行叶黄素的洗脱分离。依据色谱柱末段颜色浓度区分玉米黄质和黄体素, 收集第二个主要出柱组分(黄体素)的中间部分, 并在其出柱结束时立即停止洗脱收集。接着用乙醇冲洗色谱柱至液相色谱不再检测出洗脱液中含有叶黄素和玉米黄质。重复4次加料和分离制取过程, 合并全部黄体素洗脱液, 26℃真空旋蒸回收溶剂, 至没有溶剂馏出后, 在45℃下真空干燥。收集晶体, 以全反式-β-阿朴-8'-胡萝卜素为内标物, 高效液相色谱法^[16]检测其黄体素含量。将所制高纯度叶黄素晶体装入铝箔袋抽, 真空后置于4℃下冷藏备用。

1.4 叶黄素酯和叶黄素的高效液相色谱法定量分析

采用高效液相色谱内标法^[16]测定高纯度叶黄素中黄体素的含量, 色谱条件参照Zorn^[6]等人的方法。使用YMC-C30色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 前端串联保护柱(4.0 mm×10 mm, 5 μm), 柱温保持35℃。流动相A: 甲醇/甲基叔丁基醚/水(81:15:4, v/v/v), 流动相B: 甲醇/甲基叔丁基醚/水(6:90:4, v/v/v)。洗脱梯度是A在39 min内从99%降到44%, 然后在45 min时降至0, 至50 min恢复100%然后在100%A流动相条件下继续以1 ml/min的流速洗脱至55 min。基于文献报道的LC-MS^[17]方法在LCMS8030液质联用仪中定性叶黄素乙酸酯。

反应过程和反应后叶黄素与叶黄素酯的定量分析按照类似的方法, 以产物与反应物的出峰面积及其相对比率计算反应的转化率。

1.5 Novozym 435脂肪酶在亚临界R134a介质中的稳定性研究亚临界R134a体系中酶的稳定性是酶催化酯化反应的基础。酶的稳定性实验在图2所

示的反应装置中进行。

1.5.1 压力对酶稳定性的影响

称取0.20 g脂肪酶置于高压釜中, 密闭后加热。通过可控硅精密电加热温控系统保持温度稳定在试验温度(40 ℃)。打开R134a储罐, R134a经冷却器液化后由柱塞泵加压进入反应釜。每次试验达到选定的不同压力:4 MPa、6 MPa、8 MPa和10 MPa后停止柱塞泵, 关闭储罐。保压至试验设计的时间(6 h)后, 打开排料阀放料, 酶被过滤分离器截留, R134a流体经接样罐汽化后回收。从酶分离器中收集酶, 测定酶活力, 即残余酶活力。残余酶活力与未经亚临界R134a处理的初始酶活力的比值即为酶活残余率, 用来评价酶在亚临界R134a中的稳定性。

1.5.2 温度对酶稳定性的影响

称取0.20 g脂肪酶置于高压釜中, 密闭后通过可控硅电加热温控系统分别调温至30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃, 然后打开R134a储罐, R134a经冷却器液化后由柱塞泵加压进入反应釜。达到预定的试验压力(8 MPa)后停止柱塞泵加压, 关闭储罐。保温保压至试验设计的时间(6 h)后, 打开排料阀放料, 酶被过滤分离器截留, R134a流体经接样罐汽化后回收。从酶分离器中收集酶, 分别测定酶活力。

1.5.3 酶活度测定^[15]

取10 g聚乙烯醇, 加1 L水, 充分振荡, 直到分散良好。加入0.1 mol/L HCl 5 ml, 混合物加热到75~85 ℃, 直到完全溶解。冷却后用0.1 mol/L NaOH溶液调pH至5.0, 然后加入橄榄油至0.1 mol/L, 在振荡器上充分振荡5 min, 使底物充分乳化。取2只125 ml磨口三角烧瓶, 各加10 ml新配制的PVA乳化底物、5 ml Tris-HCL缓冲液和100 mg固定化酶待测样品。其中一瓶加热使酶失活作为对照样。然后加玻璃塞密封, 置37 ℃下保温4 h, 然后加入30 ml乙醇-丙酮(1:1)溶液, 中止酶活力并使溶液破乳。加数滴酚酞指示剂, 用精确标定的0.05 mol/L NaOH溶液滴定脂肪酶所释放的游离脂肪酸量。计算单位时间单位质量的脂肪酶活力。将使用前后的固定化酶活度进行对比, 可以得到酶活残留率, 用以表征酶活的变化程度。

1.6 酶催化叶黄素酯化反应

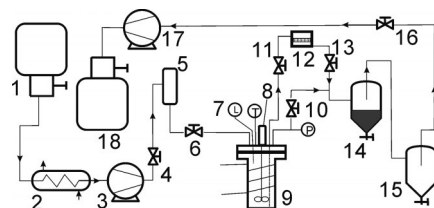
叶黄素(黄体素)分子含有两个可酯化的羟基, 在与过量的乙酸酐或乙酸反应时, 理论上将

得到叶黄素二乙酸酯。叶黄素二乙酸酯(分子量652.96)的分子结构如图1所示。传统化学法使用乙酸为酯化剂时, 需要强酸作为催化剂, 并且需要不断将水共沸蒸发分离, 以便化学平衡向酯化的方向移动。本研究分别使用乙酸和乙酸酐为酯化剂, 研究反应产生的水分及其它因素对酶催化酯化叶黄素反应转化率的影响。

在图2所示的装置中, 称取1.14 g(0.002 mol)高纯度叶黄素(分子量568.89)、1.20 g(0.02 mol)冰乙酸(分子量60.05)或2.04 g(0.02 mol)乙酸酐(分子量102.09)和1.14 g固定化脂肪酶制剂Novozym435置于高压反应釜中, 密封后, 通过电热控温系统保温至40 ℃, 温度稳定后开始通过亚临界流体加料柱塞泵泵入R134a流体, 待压力达到预设试验值后停止泵加反应介质。通过温控系统和加压泄压系统控制反应的温度和压力, 保持搅拌速率30 rpm, 达到反应设定的时间后, 降温, 出料, 分离回收R134a气体后, 用200 ml正己烷涮洗接样罐, 溶解固体残余物, 以高效液相色谱法检测其中反应物和产物比例的变化, 计算转化率。

以叶黄素反应制取叶黄素二乙酸酯的转化率为研究目标, 固定醇/酸(酸酐)比为1:10, 固定酶的用量和叶黄素底物的用量, 采用乙酸和乙酸酐分别进行3因素3水平的正交试验, 温度因素水平为:40 ℃、50 ℃、60 ℃, 压力因素水平为:6 MPa、8 MPa、10 MPa, 反应时间因素水平为:2 h、4 h、6 h, 考察温度、压力、反应时间对乙酸及乙酸酐两个反应体系的目标产物转化率的影响。

反应产物叶黄素二乙酸酯以液相色谱-质谱法定性和以高效液相色谱测定相对含量以计算酯化反应转化率。



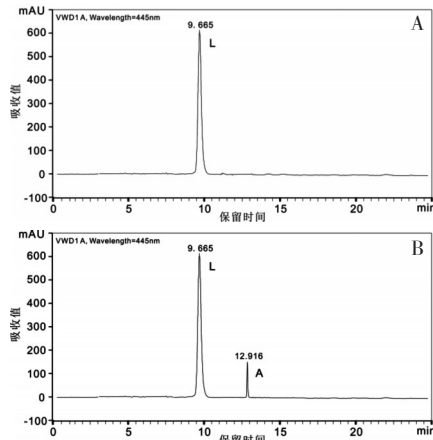
注: 1: R134a储罐; 2: 制冷机; 3: 柱塞计量泵; 4: 调压阀; 5: 缓冲罐; 6: 止回阀; 7: 超声波单点液位探测器; 8: 磁力搅拌电机; 9: 高压反应釜; 10: 排气阀; 11: 排料阀; 12: 酶分离器; 13: 减压阀; 14, 15: 接样罐(II); 16: 稳压阀; 17: 压缩机; 18: 回收罐

图2 亚临界R134a酶促酯化实验装置图

2 结果与讨论

2.1 高纯度叶黄素晶体中黄体素含量

用1.3.2所述的方法, 共制得12.6 g高纯度叶黄素晶体(黄体素)。分别混合均匀后以高效液相色谱内标法检测, 黄体素含量检测值为96.4%。见图3。



注: A:叶黄素标准品谱图; B:内标谱图

图3 叶黄素(L)及内标物β-8'-阿朴醛(A)的高效液相色谱图

2.2 R134a 介质中酶的稳定性

亚临界R134a体系压力对脂肪酶稳定性的影响结果如图4(A)所示。在试验选定的压力范围内(4~10 MPa), 试验选取的脂肪酶均没有出现酶活的降低, 反而在各压力条件下均呈现不同程度的酶活提高。脂肪酶Novozym 435在8 MPa的压力(温度40℃, 6 h)下, 酶活残余率最高, 达到157%, 即使在酶活残余率最低的4 MPa条件下, 酶活残余率也达到147%。这说明Novozym 435脂肪酶在本试验所选取的亚临界R134a介质压力条件中可以保持很高的稳定性。压力超过8 MPa之后, 酶活残余率有所下降, 10 MPa时降低到151%。需要指出的是, 在试验选定的压力范围内(4~10 MPa), 亚临界R134a对许多物质的溶解能力已大于超临界CO₂。而压力的进一步提高, 亚临界R134a对极性物质的溶解能力随压力提高而增加的趋势明显变缓, 更高亚临界R134a体系酶催化反应研究压力带来的设备投资的增加非常显著。

另一方面, 如图4(B)所示, 在固定的8 MPa、6 h的试验条件下, 在各温度条件下, 酶活残余率均高于140%, 而在30℃下达到163%。这说明以

上四种脂肪酶在亚临界R134a体系中可以保持很高的热稳定性。随着温度的提高(在温度范围内), Novozym 435脂肪酶的酶活残余率呈现逐渐缓慢下降的趋势。

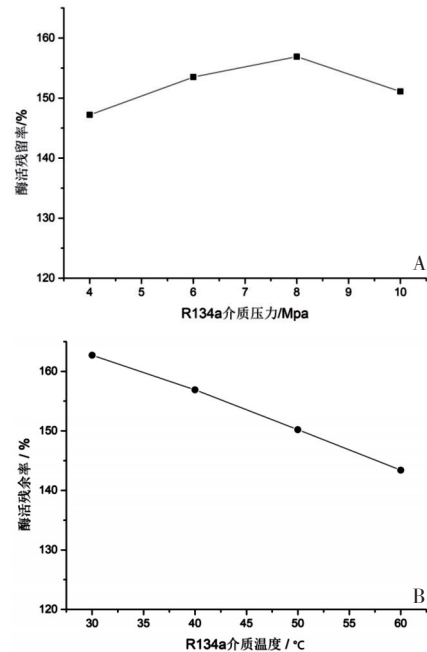


图4 R134a 介质压力(A)温度(B)对Novozym 435脂肪酶酶活度的影响

2.3 乙酸为酯化剂的酶催化反应影响因素及极差分析

叶黄素与乙酸在R134a中的酶催化酯化正交反应试验结果如表1所示。

2.4 乙酸酐为酯化剂的酶催化反应影响因素与极差分析

叶黄素与乙酸在R134a中的酶催化酯化正交反应试验结果如表2所示。

2.5 叶黄素酶催化酯化反应转化率

研究表明:在选定的试验因素和因素水平范围内, 影响R134a中脂肪酶催化叶黄素与乙酸酯化反应制叶黄素二乙酸酯因素中, 反应时间影响最大。随着反应时间的推移, 反应慢慢达到平衡。而随着反应温度的升高, 反应速率加快, 反应体系趋向更快达到平衡, 但是与此同时, 反应平衡也在向着水解的方向略有推移。

在40℃、10 MPa的反应条件下, 乙酸体系经6 h反应后, 达到其试验范围内的最大二酯转化率为

表1 叶黄素与乙酸在亚临界R134a中的正交试验

序号	反应温度/°C	反应时间/h	反应压力/MPa	反应转化率/%
1	40	2	6	50.21
2	40	4	8	60.09
3	40	6	10	73.92
4	50	2	8	56.01
5	50	4	10	65.77
6	50	6	6	73.32
7	60	2	10	60.14
8	60	4	6	65.78
9	60	6	8	69.07
K1	184.22	166.36	189.31	
K2	195.10	191.64	185.17	
K3	194.99	216.31	199.83	
k1	61.41	55.45	63.10	
k2	65.03	63.88	61.72	
k3	64.99	72.10	66.61	
R	3.62	16.65	4.89	

表2 叶黄素与乙酸酐在亚临界R134a中的正交试验

序号	反应温度/°C	反应时间/h	反应压力/MPa	反应转化率/%
1	40	2	6	60.25
2	40	4	8	82.14
3	40	6	10	94.89
4	50	2	8	66.01
5	50	4	10	90.56
6	50	6	6	94.65
7	60	2	10	60.39
8	60	4	6	89.27
9	60	6	8	90.07
K1	210.19	166.36	216.71	
K2	223.5	231.64	207.17	
K3	239.73	279.61	238.19	
k1	70.06	55.45	72.24	
k2	74.5	77.21	69.06	
k3	79.91	93.2	79.4	
R	9.85	37.75	10.34	

73.9%。

从各次以乙酸为酯化剂的反应所对应的产物液相色谱图可以看到, 其反应产物中除了叶黄素二乙酸酯外, 都生成了叶黄素单乙酸酯^[18]。色谱图中, L代表叶黄素, L-A代表叶黄素乙酸酯, L-di-A代表叶黄素二乙酸酯。试验结果证明, 在乙酸与叶黄素

的酯化反应过程中, 即使在水溶解度低的R134a体系中, 也存在着酯化与水解的平衡。既存在叶黄素与叶黄素单酯的动态平衡, 也存在叶黄素单酯与叶黄素二酯的动态平衡。(图5A)

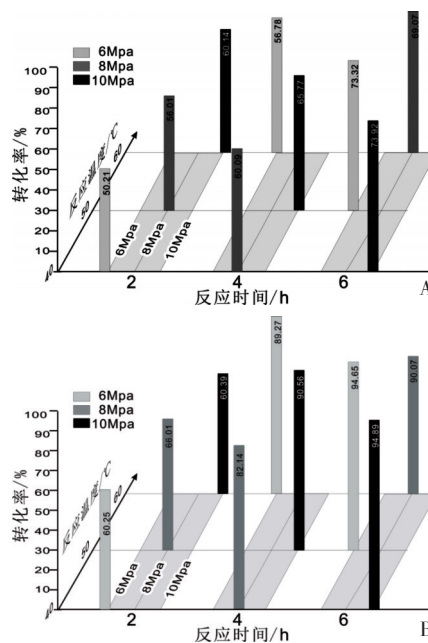


图5 叶黄素与乙酸(A)/乙酸酐(B)在亚临界R134a中的反应转化率

与之形成对比的是, 在使用乙酸酐为酯化剂的反应体系里, 所有9组反应的产物均未发现叶黄素单乙酸酯(图5B)。这有可能与乙酸酯化反应生成水, 而乙酸酐酯化反应没有生成水有关。水的产生, 使得以乙酸为反应物的酯化反应平衡向着水解的方向略有移动, 并且酯化反应不够彻底, 即使在乙酸和叶黄素的摩尔比达到10:1的高比率, 也不能使单酯全部转化为双酯(图6)。而在乙酸酐体系中, 因为不存在反向的水解因素, 因此反应进行得较为彻底, 反应转化率也比相同条件的乙酸体系高很多(图7)。同样是在40 °C、10 MPa条件下, 叶黄素与乙酸酐在R134a中进行的Novozym 435酶催化酯化反应达到最大的二酯转化率为94.9%(图8)。转化率明显高于同样条件下的叶黄素与乙酸的酶催化酯化反应体系。

两组反应转化率的正交试验数据表明, 叶黄素与乙酸酐和乙酸的Novozym 435酶催化酯化反应都在较低的温度下达到最大的转化平衡。这说明该酯化反应在热力学上是放热反应, 较低的温度

有利于反应平衡。另一方面, 随着温度的提高, 反应速率有所提高, 可以较快地达到该温度下的最高转化平衡。

由于乙酸酐在酯化反应中对叶黄素的转化率比乙酸大得多, 因此可认为, 乙酸酐比乙酸更适合作为酶催化酯化制备叶黄素二乙酸酯反应的酯化剂。

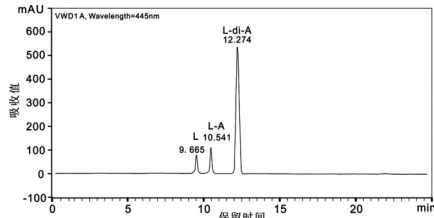


图6 叶黄素与乙酸反应制备叶黄素酯的产物液相色谱图

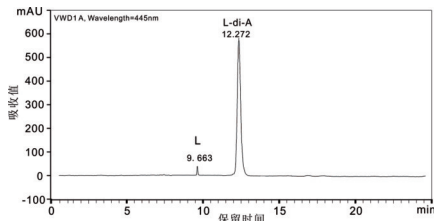


图7 叶黄素与乙酸酐反应制备叶黄素酯的产物液相色谱图

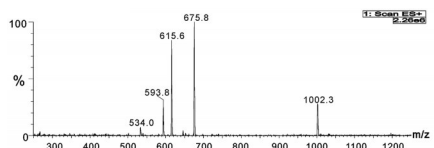


图8 叶黄素二乙酸酯的正离子电喷雾电离-质谱图

3 结论

通过高效液相色谱、液相色谱-质谱联用等分析技术, 研究了脂肪酶催化叶黄素与乙酸或乙酸酐在亚临界R134a介质中制备叶黄素二乙酸酯的反应转化率。在250 ml高压磁力搅拌反应器中, 0.002 mol(1.14 g)高纯度叶黄素分别与0.02 mol冰乙酸和0.02 mol乙酸酐(1:10 mol: mol)在1.14 g大孔丙烯酸树脂固定的南极假丝酵母脂肪酶B(Novozym 435)的催化下进行酯化反应。在试验范围内, 乙酸和乙酸酐均在40℃、10 MPa、6 h的条件下获得最大的二酯转化率。乙酸酐对叶黄素的最大转化率为94.9%, 明显高于乙酸对叶黄素的最大转化率73.9%。研究表明, 亚临界R134a流体是脂肪酶催化叶黄素酯化反应的适合介质, 乙酸

酐是叶黄素在亚临界R134a中酯化制备叶黄素二乙酸酯的理想酯化剂。

参考文献:

- [1] Breithaupt D E, Wirt U, Bamedi A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2002, 50:66-70.
- [2] Tyczkowski J, Hamilton P B. Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals [J]. *Poultry Science*, 1986, 65:1526-1531.
- [3] Breithaupt D E. Enzymatic hydrolysis of carotenoid fatty acid esters of red pepper (*Capsicum annum* L.) by a lipase from *Candidarugosa* [J]. *Zeitschrift fur Naturforschung.C*, 2000, 55:971-976.
- [4] Cordona, Mario D T, Rodriquez, et al. Esterification of xanthophylls [P].US:7220874, 2007-3-22.
- [5] Katsivela E, Kleppe F, Lang S, Wagner F. Ustilago maydis lipase I. Hydrolysis and ester - synthesis activities of crude enzyme preparation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17:739-745.
- [6] Zorn H, Breithaupt D E, Takenberg M, et al. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(5):623-628.
- [7] Abdala1 A F, Gallardo A P, Olvera L G, et al. Hydrolysis of carotenoid esters from *Tagetes erecta* by the action of lipases from *Yarrowia lipolytica* [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, (4):5-16.
- [8] Yan Y, Bornscheuer U T, Schmid R D. Lipase - catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters [J]. *Biotechnology Letters*, 1999, 21:1051-1054.
- [9] 吴晓娟, 单良, 金青哲, 等. 有机相脂肪酶催化合成柠檬酸甘油酯[J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(4):82-85.
- [10] 徐大刚, 肖禄生, 蔡扬, 等. 用脂肪酶非水相生物催化合成己酸乙酯的研究[J]. *精细化工*, 2004, 21(4):279-281.
- [11] 杨云裳, 许建国, 张应鹏, 等. 酶法合成咖啡酸叶黄素酯的研究[J]. *食品添加剂*, 2011, 342(2):283-288.
- [12] Fletcher D L. A method for estimating the relative degree of saponification of xanthophyll sources and feedstuffs [J]. *Poultry Science*, 2006, 85(5):866-869.
- [13] 辛嘉英, 郑妍, 赵冠里, 等. VE阿魏酸酯的酶法合成及抗氧化性的研究[J]. *食品科学*, 2006, 27(10):229-233.
- [14] 王子田, 苏剑晓, 杜伟, 等. Lipozyme TL IM催化油酸酯化反应制备1, 3-甘油二酯[J]. *高等学校化学学报*, 2015, 36

(8):1535-1541.

- [15] 于刚, 徐伟, 栾东磊, 等. 亚临界流体中酶催化制备富含多不饱和脂肪酸甘油酯[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(2):238-242.
- [16] Li H B, Chen F, Zhang T Y, et al. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed countercurrent chromatography[J]. Journal of Chromatography

A, 2001, 905(1):151-155.

- [17] 宁正祥. 食品成分分析手册, 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [18] Makoto K, Takashi M, Ryouhei M, et al. A Novel Carotenoid Derivative, Lutein 3-Acetate, Accumulates in Senescent Leaves of Rice[J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50(8):1573-1577.

(上接第28页)

期内肾小球的功能障碍造成的。切口附近的肾小球由于切口机械性损伤、微血管损伤、以及肾小管损伤, 使得肾单位的结构受到影响, 使血液经肾小球滤过的过程受到破坏, 受影响的肾单位中血液部分或全部直接滤过肾小球进入肾小管和集合管, 最终可表现为CCr-GFR的上升以及血尿的形成。这种情况下肾小球滤过能力下降属于机械性原因而非病理性器质性原因。随着时间的推移, 纤维增生与纤维化逐渐形成, 被破坏的肾小管上皮和肾小球得以修复, 影响肾小球滤过能力的机械性原因解除后, CCr-GFR则得到改善, 肾脏功能亦得到恢复。

组织学检查结果显示, 纤维增生与纤维化主要集中于切面两侧100~200 μm处以及实质中缝线穿行的区域, 越靠近切口与越靠近缝线穿行区域的组织纤维增生与纤维化的程度越高, 在皮质区域, 切口中央纤维增生的区域内, 肾小球在形态上并未受到明显影响, 体积大小与周围无纤维化区域的相比也无显著差异, 肾小球内未见显著的梗死与变性, 但纤维化区域的肾小管上皮细胞出现了不同程度的透明样变性和轻微的水肿, 且纤维增生使得该区域内肾小管管腔体积受到压迫变小, 总体来说, 受手术影响的肾脏组织比例较小, 集中于切口的两侧, 大部分未直接切开的肾组织的组织形态并未受到明显的改变。

在本次试验中, 双侧肾切开术对于肾脏功能的影响较为有限, 在术后CCr-GFR出现暂时性的上升(18.1%), 但后期的CCr-GFR并无明显的异常。组织病理学检查可见切口有明显的纤维增生与纤维化, 以及轻微的变性, 未见其他能显著影响到肾脏功能的结构性改变和细胞性病变。术后2个月内, 除了血尿外, 实验犬未出现任何急性或慢性肾脏衰竭的

临床症状。本实验结果显示, 对健康犬实施双侧肾切开后, 对肾脏结构无明显的影响, 术后肾功能指标在短期内出现轻微上升, 但很快就恢复正常。

参考文献:

- [1] Lulich J P, Osborne C A. Urolithiasis: past, present and future [J]. Journal of Small Animal Practice, 2012, 53(11):621-622.
- [2] Stone E A, Robertson J L, Metcalf M R. The effect of nephrotomy on renal function and morphology in dogs [J]. Veterinary Surgery, 2002, 31(4):391-397.
- [3] 周庆国, 黄湛然, 陈思敏. 犬单侧肾切开、切除后的肾功能变化; proceedings of the 中国畜牧兽医学会小动物医学分会第四次学术研讨会、中国畜牧兽医学会兽医外科学分会第十六次学术研讨会, 中国内蒙古呼和浩特, F, 2009 [C].
- [4] Lanz O I, Waldron D R. Renal and ureteral surgery in dogs [J]. Clinical Techniques in Small Animal Practice, 2000, 15(1):1-10.
- [5] Tobias K. Renal and Ureteral Surgery [M]. Nephrology and Urology of Small Animals. John Wiley & Sons, Ltd. 2011:596-616.
- [6] Gahring D R, Crowe D T, Powers T E, et al. Comparative renal function studies of nephrotomy closure with and without sutures in dogs [J]. Javma - journal of The American Veterinary Medical Association, 1977, 171(6):537.
- [7] Fitzpatrick J M, Sleight M W, Braack A, et al. Intrarenal Access: Effects on renal function and morphology [J]. British Journal of Urology International, 1980, 52(6):409-414.
- [8] Ahlgren I, Aronsen K F, Bjorkman I, et al. The hemodynamic effect of halothane in the normovolemic dog [J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 1978, 22(1):83-92.
- [9] Schroeder C A. Renal disease [M]. Canine and Feline Anesthesia and Co-Existing Disease. John Wiley & Sons, Inc. 2014:116-28.
- [10] 黄朝友. 原位降温肾实质切取取石术47例分析[J]. 华西医学, 2006, 4:802.
- [11] Braun J P, Lefebver H P, Watson A D J. Creatinine in the Dog: A Review [J]. Veterinary Clinical Pathology, 2003, 32(4):162-79.

蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全动物模型建立

龚宝勇, 刘晓霖, 谭伟江, 罗挺, 王希龙, 杨丰华*

(广东省实验动物监测所/广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663)

摘要:本试验的目的是建立蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全动物模型及获得其评价指标。试验方法:蕨麻小型猪麻醉后在超声引导下,经右颈总动脉,采用套管插管戳破部分瓣膜建立主动脉瓣关闭不全动物模型;检测建模前,建模后即刻及1个月后动物主动脉弓血流峰值速度;血液生理学指标和血液生化指标,血压变化。试验结果:建模后即刻及1个月后主动脉弓血流峰值速度增加;血压降低;血液生理学指标无显著变化;血液生化指标中ALT、AST、CK、LDH建模1个月后显著升高,其他指标无显著变化。结论:在超声引导下经右颈总动脉套管插管建立蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全模型可行,操作简单、重复性好,效果可靠,建模后1个月不会发生自愈,初步获得主动脉瓣关闭不全动物模型评价指标。

关键词:蕨麻小型猪; 主动脉瓣关闭不全; 动物模型

中图分类号:S828.9 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2017)06-0037-03

Establishment of an animal model with aortic valve insufficiency of Juema minpigs

Gong Baoyong, Liu Xiaolin, Tang Weijiang, Luo Ting, Wang Xilong, Yang Fenghua*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510063, China)

Abstract: The study was conducted to establish an animal model of aortic valve insufficiency in Juema minpigs and obtain its evaluation index. After Juema minpigs anesthesia, we use catheterization to poke part of the right common carotid artery valve to establish aortic valve insufficiency animal model. Aortic arch blood flow peak, blood physiological and biochemical indexes, blood pressure were measured immediately after the operation and one month later, respectively. One month after the operation, we got the results as follow. The speed of aortic arch blood flow peak was increased. Blood pressure was decreased. The blood physiological indexes were not significantly changed, but the levels of ALT, AST, CK and LDH in the blood biochemical indexes were significantly increased, while the other indexes were not significant difference. The results suggest that the model of aortic valve regurgitation was viable, that was easy to operate. The reproducibility of the model was good and its effect was reliable. No self-healing occurred in 1 month after modeling. Primary evaluation index of animal model of aortic valve closure was obtained.

Keywords: Juema minpigs; aortic valve insufficiency; animal model

收稿日期:2017-10-30

基金项目:广东省省级科技计划项目(2016A020216019, 2015A030302035, 2013A061402001)

作者简介:龚宝勇(1982-),男,硕士研究生,兽医师.E-mail:gby@gdlami.com

*通讯作者:杨丰华(1970-),女,博士,副研究员.E-mail:fenghua.yang@gdlami.com

藏麻猪又名合作猪、山猪,是甘南当地藏族群众在海拔3000 m左右的严酷自然环境下以散养方式培育出来的一个小型、优秀、独特的地方猪品种^[1]。藏麻小型猪性情较温顺,利于抓取保定^[2]。小型猪心血管系统与人类相似,广泛用于心血管疾病模型研究^[3]。在猪的主动脉瓣膜疾病相关的研究方面,导管穿刺技术应用于测量主动脉瓣膜的面积、瓣膜修复时引导正确的位置、消除房颤,也有利用导管技术制作二尖瓣返流的模型^[4, 5],本研究采用两种技术结合起来制作藏麻小型猪主动脉瓣关闭不全动物模型及初步获得其评价指标。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验动物

藏麻小型猪5头,300~360日龄,体重20~30 kg,雄性,购自广州市饲料研究所,实验动物许可证编号:SCXK(粤)2015-0036。本实验通过广东省实验动物监测所实验动物管理与使用委员会(IACUC)批准,IACUC编号为:IACUC2016011。动物按照AAALAC管理要求饲养于广东省实验动物监测所,使用许可证编号:SYXK(粤)2012-0122。

1.1.2 仪器及材料

意大利百胜 MyLab30 超声系统;中国迈瑞 iPM12Vet 兽用监护仪;日本 Sysmex XT-2000iv 全自动五分类血液分析仪;日立 7020 全自动生化分析仪;10F 房间隔穿刺针套装, Meir Medical Ireland Ltd。

1.2 方法

1.2.1 手术过程

藏麻小型猪丙泊酚(1 ml/kg)诱导麻醉后气管插管,麻醉呼吸机异氟烷维持麻醉,仰卧保定。碘伏消毒后,沿颈部中线纵行剪开皮肤,钝性分离肌肉和结缔组织,分离出右颈总动脉。使用丝线将右颈总动脉远端结扎,近端用动脉夹暂时闭塞血流,同时在两封闭端间放另一丝线备用。在两端封闭的右颈总动脉之间剪开缺口,插入带内置10 F穿刺针的套管。在超声引导下,将套管沿着右颈总动脉进入主动脉弓并继续前行到主动脉瓣口前,将内置穿刺针从套管中伸出并戳破部分瓣膜。取出穿刺针和套管,关闭右颈总动脉缺口,缝合颈部皮肤。见图1(图见第52页)。术中护理:耳静脉建立静脉通路,

在插入穿刺针的套管前缓慢推注肝素钠100 U/kg,术中保温,用iPM12Vet兽用监护仪密切监护动物体温、血氧、心电、血压等指标。术后护理:抗感染用头孢拉定0.1 g/kg/次,2次/天,连用5天;镇痛用福欣安0.05 ml/kg/次,1次/天,连用3天。

1.2.2 检测指标

建模前和建模后即刻及1个月后检测主动脉弓血流峰值速度;血压;血液生理学指标和血液生化指标。

1.2.2.1 主动脉弓血流峰值速度,采用意大利百胜 MyLab30 超声系统检测。

1.2.2.2 血压,采用中国迈瑞 iPM12Vet 兽用监护仪检测。

1.2.2.3 血液生理指标:共8项,包括白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞比值(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板计数(PLT)等。

1.2.2.4 血液生化指标:共14项,包括谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)、总胆红素(TBILI)、肌酸磷酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)等。

1.3 数据处理

用EXCEL软件对所测数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 主动脉弓血流峰值速度变化见表1,藏麻小型猪建模后即刻及建模后1个月主动脉弓血流峰值速度较建模前显著升高,建模后即刻与建模后1个月主动脉弓血流峰值速度均值大于0.4 m/s。

2.2 血压变化见表2,藏麻小型猪建模后即刻及建模后1个月与建模前比较,收缩压、舒张压、平均动脉压具有显著性差异,脉搏无显著性差异。

表1 藏麻小型猪主动脉瓣关闭不全建模前后主动脉弓血流峰值速度变化

	主动脉弓血流峰值速度(m/s)
建模前(n=5)	0.15±0.03
建模后即刻(n=5)	0.44±0.02
建模后1个月(n=5)	0.41±0.02

表2 蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全建模前后血压变化

项目/(单位)	建模前(n=5)	建模后即刻(n=5)	建模后1个月(n=5)
收缩压(mmHg)	154±6	133±4*	127±6*
舒张压(mmHg)	100±7	80±12*	92±9*
平均动脉压(mmHg)	122±6	101±12*	108±4*
脉搏(次/min)	104±11	110±14	108±11

注:与建模前比较, *:P<0.05, 差异有显著性

2.3 血液生理指标变化见表3, 无明显差异。

2.4 血液生化指标变化见表4, 蕨麻小型猪建模后1个月与建模前比较, ALT、AST、CK、LDH有显著性差异, 较建模前显著升高。

表3 蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全建模前后血液生理指标变化

项目/(单位)	建模前(n=5)	建模后即刻(n=5)	建模后1个月(n=5)
WBC(10 ⁹ /L)	10.6±0.5	10.0±0.5	11.5±1.0
RBC(10 ¹² /L)	8.2±0.7	8.3±0.7	8.7±1.3
HGB(g/L)	152.4±11.5	142.6±18.1	140.2±20.2
HCT(%)	48.0±2.8	47.4±3.1	47.8±2.8
MCV(fL)	58.8±1.8	58.6±2.4	58.0±2.9
MCH(pg)	18.7±0.6	18.5±0.8	18.7±0.6
MCHC(g/L)	317.2±6.2	322.2±5.4	321.4±3.0
PLT(10 ⁹ /L)	411.0±84.0	410.6±88.9	416.2±88.2

表4 蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全建模前后血液生化指标变化

项目/(单位)	建模前(n=5)	建模后即刻(n=5)	建模后1个月(n=5)
ALT/(U·L ⁻¹)	42.2±1.9	42.2±1.3	98.8±8.8*
AST/(U·L ⁻¹)	24.4±1.9	24.0±1.6	108.8±5.1*
TP/(g·L ⁻¹)	65.8±1.8	66.4±2.7	63.0±2.8
ALB/(g·L ⁻¹)	34.2±2.6	34.7±1.9	28.4±0.4
GLB/(g·L ⁻¹)	33.7±2.3	33.7±2.3	33.6±1.4
TBIL/(μmol·L ⁻¹)	2.4±0.5	2.5±0.5	1.9±0.5
ALP/(U·L ⁻¹)	71.4±7.7	72.6±5.5	60.6±3.8
GLU/(mmol·L ⁻¹)	5.8±0.6	5.8±0.6	5.8±0.6
BUN/(mmol·L ⁻¹)	5.2±0.5	5.2±0.5	5.0±0.6
CREA/(μmol·L ⁻¹)	67.4±3.8	68.6±1.7	63.8±9.0
TC/(mmol·L ⁻¹)	4.7±1.6	4.6±1.6	6.3±0.2
TG/(mmol·L ⁻¹)	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.3
CK(U·L ⁻¹)	184.8±63.6	183.6±67.1	1532.2±239.6*
LDH(U·L ⁻¹)	47.0±3.4	47.2±3.3	229.0±91.1*

注:与建模前比较, *:P<0.05, 差异有显著性

3 结论与讨论

目前心脏瓣膜疾病介入治疗学已成为心脏病学研究领域新的热点, 如何制作出稳定、可靠的主动脉瓣关闭不全动物模型, 及动物模型建立后评价指标的确定, 是研究此类疾病的关键所在。国内外主动脉瓣关闭不全造模的方法主要采用以下方法:通过X线引导及超声心动图引导^[6], 开胸外科手术直视下造模^[7], 内科介入方法造模^[8]等。

孙妍等采用超声引导建立了小型猪主动脉瓣反流模型^[9], 但未建立评价模型成功的具体指标。王萧建立主动脉瓣关闭不全法建立兔模型^[10], 明确了部分造模成功评价方法。小型猪主动脉弓血流峰值速度、血压、血液生理指标、血液生化指标是评价动物健康的重要指标^[11, 12]。蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全建模后即刻及建模后1个月主动脉弓血流峰值速度较建模前显著升高, 建模后即刻与建模后1个月主动脉弓血流峰值速度均值大于0.4 m/s。建模后即刻及建模后1个月与建模前比较, 收缩压、舒张压、平均动脉压具有显著性差异, 脉搏无显著性差异。建模后1个月与建模前比较, ALT、AST、CK、LDH有显著性差异, 较建模前显著升高。

本研究在超声引导下经右颈总动脉套管插管建立蕨麻小型猪主动脉瓣关闭不全模型可行, 操作简单、重复性好, 效果可靠, 建模后1个月不会发生自愈, 并初步确定主动脉弓血流峰值速度、血压、ALT、AST、CK、LDH可作为造模成功与否的参考指标。

参考文献:

- [1] 甘肃省质量技术监督局. DB62/T1247-2004 蕨麻猪[S]. 2004.
- [2] 杨勤, 左彩兰, 刘汉丽, 等. 甘肃省地方特色猪-甘南蕨麻猪[J]. 中国猪业, 2007(8):23-26.
- [3] 田玉龙, 钟红珊. 五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25(4):365-365.
- [4] Bjerre M, Jensen H, Andersen JD, et al. Chronic ischemic mitral regurgitation induced in pigs by catheter-based coronary artery occlusion[J]. Journal of Heart Valve Disease, 2008, 17(3):283-9.
- [5] Jensen H, Jensen M O, Nielsen S L. Surgical treatment of functional ischemic mitral regurgitation [J]. Journal of Heart Valve Disease, 2015, 24(1):30-42.
- [6] Plante E, Couet J, Gaudreau M, et al. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aorticvalveregurgitation

酵母培养物(百惠康)替代鱼粉对草鱼生长性能和抗病力的影响

李永娟, 张含乐, 周文豪*

(北京英惠尔生物技术有限公司生物技术研究院, 北京 100081)

摘要:本试验在基础饲料中分别添加不同比例的酵母培养物(百惠康)替代鱼粉对草鱼进行养殖,旨在评估百惠康对草鱼生长性能和抗病力的影响。选取初始体重为9.26 g左右的健康草鱼800尾,随机分为4组,每组5个重复,每个重复40尾,于循环水系统中进行为期8 W的养殖。基础饲料中鱼粉含量为3%,用百惠康分别替代基础饲料中1%,2%和3%鱼粉配制百惠康替代组饲料,每组分别投喂对照组饲料和百惠康饲料。养殖试验结束后,腹腔注射浓度为 2.5×10^8 cfu/ml的嗜水气单胞菌1.0 ml进行攻毒试验,计算72 h内的累计死亡率。养殖试验结果显示,各组成活率均为100%,增重率及特定生长率和饲料系数之间均不存在显著性差异。攻毒后,百惠康替代组与对照组之间累积死亡率均无显著性差异,除全部替代组高于对照组外,部分替代组与对照组相比,累积死亡率相同或降低。结果表明,百惠康可以部分替代草鱼饲料中鱼粉,最适替代比例有待继续研究。

关键词:酵母培养物(百惠康); 草鱼; 生长性能; 抗病力

中图分类号:S963.32+7 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2017)06-0040-04

Effect of yeast culture instead of fish meal on growth performance and anti-disease capacity in *Ctenopharyngodon idellus*

Li Yongjuan, Zhang Hanle, ZhouWenhao*

(Beijing Enhalar Institute of Biotechnology, Beijing 100081)

Abstract: An 8-week feeding trial was conducted to study the effects of replacement of fish meal by yeast culture on growth performance and anti-disease of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. A total of 800 grass carp with an initial body weight of 9.26 g were randomly divided into 4 groups and fed respectively with the basal diet and the tested diets. Each group had 5 repetitions with 40 fish. The basal diet (control diet) contained 3% fish meal, and the test diets were prepared by replacement of fish meal by yeast culture at 1%, 2% and 3%, respectively. After the feeding trail, the fish remained were challenged with *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. The results of the feeding trail showed that the survival rate was 100% of all the groups. No significant differences were found in weight gain rate, special growth rate and feed conversion rate among the groups ($P > 0.05$). After *Aeromonas hydrophila* challenging for 72 h, the accumulative mortality rate in all the groups was not significantly different ($P > 0.05$). In conclusion, yeast culture can replace fish meal by certain ratio and the optimum replacement ration need to be researched furtherly of grass carp.

Keywords: Yeast culture; grass carp; growth performance; anti-disease

收稿日期:2017-11-10

作者简介:李永娟(1989-),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事水产动物营养与饲料研究. E-mail:715877473@qq.com

*通讯作者:周文豪(1972-),男,湖北仙桃人,主要从事水产动物营养与饲料. Email:zhou_when_how@sina.com

众所周知, 鱼粉是水产饲料中最优质的蛋白原料。然而, 近年来国内水产养殖业的快速发展使得鱼粉用量的逐年上升和资源的锐减形成了鲜明的矛盾^[1-3]。因此, 以提高鱼虾蟹对饲料的消化利用效率, 提高水产养殖动物免疫力的非鱼粉蛋白替代原料开始受到了广大养殖者的认可^[4-6]。而随着人们对养殖病害、环境保护、食品质量与安全等问题越来越关注, 新形势下行业对水产饲料质量与功能的拓展提出了更高的要求, 水产饲料已经从仅仅承担生长速度、饲料效率、养殖产量等传统的功能, 转向兼具承担养殖动物免疫防御能力、养殖动物健康等作用的功能性饲料。酵母培养物作为一种功能性蛋白原料, 在动物营养和保健方面的作用得到了深入研究^[7]。全面禁止使用抗生素, 提倡无抗养殖生产给酵母类产品带来了极好机会。目前, 酵母培养物已广泛应用于反刍动物^[8]、单胃动物^[9]以及水产动物养殖中。酵母培养物营养丰富, 其中的增味和芳香物质等有明显的诱食性, 可以促进水产动物的消化吸收, 增强动物生长性能, 另外, 其中的酵母细胞壁等成分可增强动物机体的免疫功能。酵母培养物(百惠康)是一类由酵母菌经特定工艺发酵形成的天然微生物制品, 由变性培养基、酵母细胞和酵母代谢产物等组成, 具有调节炎症、菌群、蛋白代谢等功能。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科草鱼属, 俗称草鲩、白鲩等。因其生长迅速, 肉质肥美鲜嫩, 是我国最负盛名的重要淡水经济鱼类, 也是养殖饲料用量最大的鱼类之一。本试验采用百惠康一定比例替代草鱼饲料中的鱼粉, 研究其对草鱼生长性能以及抗病力的影响, 以期对酵母培养物的开发推广提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料和实验设计

基础饲料以鱼粉、豆粕、棉粕、菜粕为蛋白源, 试验饲料用百惠康替代基础饲料中不同比例鱼粉, 豆油为脂肪源, 面粉为糖源, 配制四种饲料。百惠康由北京英惠尔生物技术有限公司提供, 主要成分包括氨基酸、小肽、维生素、葡聚糖、甘露聚糖、核苷酸、醛酮酸活性物等。其中粗蛋白含量 $\geq 55\%$, 灰分 $\leq 8\%$; 水分 $\leq 10\%$ 。将原料粉碎过40目筛后, 按照配方要

求准确称量, 微量成分采取逐级扩大法混合均匀。添加豆油以及12%左右的纯水于混合机中搅拌均匀, 用制粒机制粒加工成粒径2.0 mm颗粒饲料, 自然风干, 用自封袋密封, 放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。饲料配方和营养成分见表1。

表1 试验饲料配方及营养成分(%干物质)

原料	对照	百惠康1	百惠康2	百惠康3
鱼粉	3.00	2.00	1.00	0.00
豆粕	20.00	20.00	20.00	20.00
菜粕	32.00	32.00	32.00	32.00
棉粕	10.00	10.00	10.00	10.00
百惠康	0.00	1.00	2.00	3.00
面粉	28.30	28.30	28.30	28.30
豆油	3.50	3.50	3.50	3.50
磷酸二氢钙	2.00	2.00	2.00	2.00
氯化胆碱	0.20	0.20	0.2	0.20
预混料	1.00	1.00	1.00	1.00
合计	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平				
粗蛋白	30.21	30.10	29.99	29.88
粗脂肪	4.94	4.87	4.79	4.71
水分	7.64	7.31	7.85	7.48
能量(MJ/kg)	3.13	3.10	3.07	3.05

1.2 实验管理

实验开始前用暂养饲料暂养2 W, 停止喂食24 h后, 挑选体质健壮、规格一致、初重约为9.26 g的草鱼800尾, 随机分为4组(每组5个重复, 每个重复40尾鱼), 随机分配于350L玻璃钢桶中。实验期间饱食投喂, 分别于8:00、11:00、14:00、17:00投喂四次, 根据摄食情况及时调整投饲量。整个实验期间溶解氧为6.5~7.0 mg/l, 水温为22.5~26.0 $^{\circ}\text{C}$, 适当换水。养殖实验持续8 W, 于北京英惠尔生物技术有限公司生物技术研究院北京通州循环水养殖系统内进行。

1.3 样品采集与攻毒实验

养殖实验结束饥饿24 h后, 称重并记录每个重复鱼的尾数, 用于计算生长性能指标增重率、特定生长率, 饲料系数和成活率。

养殖试验采样结束后, 进行嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)攻毒。菌种用LB培养基在30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中摇床培养24 h, 复壮两次。选取对数生长期的菌体, 4000 r/min离心10 min, 收集沉

淀菌体, 用生理盐水清洗。集菌后进行梯度稀释, 预试验确定半致死浓度, 制备菌体悬液。每个组随机选取40尾鱼分为4个重复, 每个重复10尾, 每个组选取大小一致的鱼40尾, 随机分为4个重复, 每个重复10尾, 每尾腹腔注射浓度为 2.5×10^8 cfu/ml嗜水气单胞菌悬液1.0 ml。观察感染鱼体出现症状, 并及时捞出死亡个体, 记录死亡尾数及时间。感染期间不间断充气, 水体不循环。攻毒试验时间为72 h, 计算累积死亡率。

1.4 计算公式及统计分析方法

成活率(survival rate, SR, %)=实验结束时鱼尾数/实验开始时鱼尾数 $\times 100$;

增重率(weight gain rate, WGR, %)=(终末均重-初始均重)/初始均重 $\times 100$;

特定生长率(special growth rate, SGR, %/d)=(\ln 终末均重- \ln 初始均重)/饲养天数 $\times 100$;

饲料系数(feed conversion rate, FCR)=摄食饲料干重/(终末体重-初始体重);

累积死亡率(accumulative mortality rate, AMR, %)=累计死亡尾数/初始尾数 $\times 100$;

试验数据用平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示, 数据分析采用SPSS20.0软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间若有显著性差异, 再作Duncan氏多重比较检验, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 实验结果

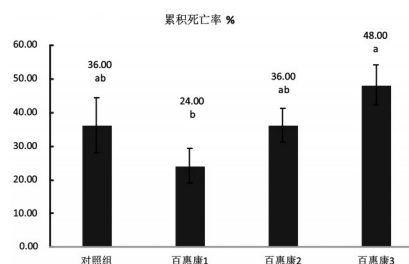
2.1 百惠康对草鱼生长性能和饲料利用的影响

由表2可知, 各组成活率均为100%。百惠康替代组的增重率略低于对照组, 但是均没有出现显著性差异($P > 0.05$)。特定生长率和饲料系数之间亦不存在显著差异($P > 0.05$)。

2.2 百惠康对草鱼抗病力的影响

注射嗜水气单胞菌后12 h, 各组鱼开始出现死亡, 病鱼离群, 活动量减少, 游动异常, 体表及腹

腔内出现不同程度的充血。感染后72 h时, 各组的累计死亡率如图1所示。其中, 百惠康1组的累计死亡率低于对照组, 百惠康2组与对照组相同, 百惠康1组累积死亡率显著低于百惠康3组($P < 0.05$), 但添加百惠康各组与对照均无显著性差异($P > 0.05$)。



注: 肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

图1 百惠康对草鱼累积死亡率的影响(%)

3 讨论

酵母源产品作为一种新型的微生态制剂, 成分复杂, 关于其对动物生长性能的影响已有大量报道。酵母培养物可以促进动物摄食, 增强对营养物质的消化吸收, 提高氮磷利用率进而对动物的生长起到一定的促进作用^[10]。目前, 酵母源产品(酵母培养物、酵母多糖、酵母细胞壁、酵母核苷酸、酵母膏等)主要作为水产动物功能性添加剂运用于饲料生产中。邱燕等^[11]研究发现添加酵母培养物能够提高草鱼的特定生长率, 降低饲料系数。团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)饲料中添加2000 mg/kg的酵母培养物其特定生长率比对照组高11.64%^[12]。粟雄高等^[13]研究发现投喂0.075%和0.100%酵母培养物分别提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)增重率17.24%、12.29%。研究学者开始逐渐关注酵母培养物做为饲料原料的可能性, 并取得了一系列的研究成果。酒糟酵母培养物部分替换草鱼饲料能够提高草鱼的生长性能, 替换量在12%以下时, 草鱼的生长性能呈

表2 百惠康对草鱼生长性能和饲料利用的影响

指标	对照组	百惠康1	百惠康2	百惠康3
初始体重/g	9.26 \pm 0.01	9.26 \pm 0.01	9.26 \pm 0.01	9.26 \pm 0.01
终末体重/g	68.78 \pm 0.67	67.40 \pm 1.12	67.16 \pm 0.63	67.53 \pm 0.74
成活率%	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
增重率%	643.32 \pm 7.16	629.74 \pm 13.14	625.31 \pm 6.83	629.43 \pm 8.12
特定生长率%/d	3.65 \pm 0.02	3.61 \pm 0.03	3.60 \pm 0.02	3.61 \pm 0.02
饲料系数	1.11 \pm 0.01	1.12 \pm 0.02	1.12 \pm 0.01	1.12 \pm 0.01

现出增长的趋势,但是当替换量达到16%时,生长性能指标出现下降^[14]。酵母菌种的选择差异,培养基的组成成分或者发酵工艺的不同必然会导致其产品效果差异。饲料配方及营养组成,替代水平,养殖模式或水体环境等亦会产生影响。本试验以百惠康替代草鱼饲料中鱼粉,结果显示百惠康对草鱼生长性能和饲料利用没有产生显著影响,说明百惠康可以作为蛋白源替代鱼粉,最适宜替代水平仍需继续验证。酵母培养物替代鱼粉时,应当根据酵母培养物的类型和饲养品种,探究最佳促进生长性能的替代比例,达到即不抑制生长又最大化的目的。

水产动物免疫机制相对不够健全,主要依靠非特异性免疫抵抗外界病原感染。酵母培养物中酵母细胞壁成分 β -葡聚糖等还能够吸附病原菌,提高动物机体免疫力^[15, 16],核苷酸类物质可以改善动物肠道菌群,提高动物抗应激能力^[17, 18],有效促进动物健康水平。本试验中百惠康部分替代鱼粉组累积死亡率不高于对照组,说明百惠康在草鱼抵抗感染能力上起到了作用。在对大口黑鲈(*Micropterus salmonides*)的研究中发现,酵母可能通过改善肠道微生物来减少病原菌的侵害^[19],对凡纳滨对虾的研究结果亦显示酵母培养物可显著提高凡纳滨对虾的非特异性免疫力^[20],对肉仔鸡研究中发现酵母培养物可以提高肉仔鸡体液免疫功能^[21]。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)饲料中单独添加虾乐和益康有促进免疫力和抗病力的作用,但是复合组效果最好^[22],这提示我们在使用酵母培养物时可以考虑复合添加。

4 结论

综上所述,酵母培养物(百惠康)可以部分替代草鱼饲料中鱼粉,最适替代比例有待继续研究。

参考文献:

- [1] 孔燕. 2014年中国鱼粉市场分析及2015年展望[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(02):72-75.
- [2] 郑丽明. 使用氨基酸指标鉴别掺假鱼粉研究概况[J]. 广东饲料, 2015, (05):38-40.
- [3] 杜玉雯, 孙琛. 我国鱼粉市场供给侧改革的影响因素及对策分析[J]. 资源开发与市场, 2016, (09):1108-1114.
- [4] 李凯年. 昆虫粉将成为未来的动物饲料[J]. 中国动物保健, 2014, (12):85-86.
- [5] 宋华军. 血浆蛋白粉生产工艺与应用效果的研究[D]. 硕士学位论文, 湖北, 华中农业大学: 2003.
- [6] 付晶晶, 黄燕华, 曹俊明, 等. 五种植物蛋白源替代鱼粉对花鲈血清生化指标、转氨酶活性及抗氧化应激参数的影响[J]. 湖北农业科学, 2015, (20):5087-5091.
- [7] 郁欢欢, 周文豪, 曾虹, 等. 酵母培养物在水产动物中的应用及作用机理研究进展[J]. 饲料工业, 2015, (18):25-29.
- [8] 孙满吉, 刘彩娟, 张永根, 等. 直接饲喂酵母培养物对奶牛瘤胃发酵的影响[J]. 动物营养学报, 2010, (05):1390-1395.
- [9] 高玲美. 高蛋白海洋酵母的初步研究[D]. 博士学位论文, 广东, 中国海洋大学: 2007.
- [10] 孙喆, 甄玉国, 鲍男, 等. 酵母培养物在动物生产中营养及保健作用的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2014, (24):65-68.
- [11] 邱燕, 叶元土, 蔡春芳, 等. 酵母培养物对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)生长性能与肠道粘膜形态的影响[J]. 饲料工业, 2010, (18):15-17.
- [12] 李高峰, 叶元土, 林炳贤, 等. 酵母培养物对团头鲂生长的影响[J]. 饲料工业, 2009, 30(22):17-22.
- [13] 粟雄高, 李小勤, 冷向军, 等. 酵母培养物和芽孢杆菌对凡纳滨对虾生长、蛋白酶活性和免疫性能的影响[J]. 海洋渔业, 2012, (02):168-176.
- [14] 李军涛. 酒糟酵母培养物部分替换饲料对草鱼生长和代谢的影响[D]. 博士学位论文, 湖北, 华中农业大学: 2016.
- [15] 孟繁伊. 酵母培养物及其在水产养殖中的应用[J]. 饲料工业, 2010:69-73.
- [16] Tian X, Shao Y, Wang Z, et al. Effects of dietary yeast β -glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2016, 215:144-155.
- [17] 黄权, 周景祥, 孟繁伊, 等. 酵母培养物对池塘饲养鲤鱼的生长性能、饲料转化及水质的影响[J]. 饲料工业, 2004, 25(05):61-62.
- [18] 姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 等. 酵母培养物水溶物对离体草鱼肠道黏膜细胞生长及细胞膜完整性的影响[J]. 动物营养学报, 2014, (11):3478-3484.
- [19] Zhou M, Liang R, Mo J, et al. Effects of brewer's yeast hydrolysate on the growth performance and the intestinal bacterial diversity of largemouth bass (*Micropterus salmonides*) [J]. *Aquaculture*, 2018, 484:139-144.
- [20] 何远法, 郁欢欢, 迟淑艳, 等. 酵母培养物对凡纳滨对虾生长性能、非特异性免疫力和抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2016, (12):4063-4072.
- [21] 周淑芹, 孙文志. 酵母培养物与抗生素对肉仔鸡生长性能及免疫机能影响的研究[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(11):9-11.
- [22] 温俊. 复合益生菌与酵母培养物对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)生长、免疫及抗病力的影响[D]. 硕士学位论文, 山东, 中国海洋大学:2007.

茂名地区2016年猪伪狂犬病流行状况调查与分析

李冰, 陈盛絮

(茂名市动物疫病预防控制中心, 广东 茂名 525000)

摘要:伪狂犬病是由疱疹病毒引起的一种急性传染病。近年来, 各地该病阳性率有回升之势, 为掌握茂名地区猪伪狂犬病的流行状况, 采用检测gE抗体的方法, 对茂名市各县区的44个种猪场进行了监测, 结果显示样品平均阳性率为52.1%, 场阳性率高达86.4%。这个结果表明该病在该市风险较大, 需采取相应的净化措施。

关键词:伪狂犬病; gE基因抗体; 流行病学

中图分类号:S852.65+1 **文献标识码:**D **文章编码:**1005-8567(2017)06-0044-03

伪狂犬病是由疱疹病毒引起的一种急性传染病, 可自然发生于猪、牛、绵羊、犬和猫, 另外, 多种野生动物、肉食动物也易感^[1]。猪是伪狂犬病毒的贮存宿主, 病猪、带毒猪以及带毒鼠类为本病重要传染源^[2]。猪发生伪狂犬病后, 其临床症状因日龄而异, 成年猪一般呈隐性感染, 可引起生长停滞、增重缓慢; 怀孕母猪可导致流产、死胎、木乃伊胎和种猪不育等综合症候群; 仔猪发病伴有呕吐、腹泻及发抖, 震颤和运动失调等神经症状, 15日龄以内仔猪发病死亡率可达100%, 断奶仔猪发病率可达40%, 死亡率20%左右; 带毒猪可引起免疫抑制并对其它疫病易感性增加, 影响其生长发育^[2]。

近年来, 茂名地区作为养猪大市深受其害。根据广东省农业厅对该病的净化要求, 为掌握该地区猪伪狂犬病的流行状况及地域分布, 2016年抽选该地区44家300头母猪以上规模猪场, 针对母猪进行采样监测。根据该市各区、县级市规模猪场数量分配采样点, 旨在为省市决策部门提供防控依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 血清样品

2016年5月~10月, 采自茂名各区、县级市44

家规模猪场种猪血清, 合计1460份血液样本。

1.1.2 检测试剂

猪伪狂犬病gpl-ELISA(即gE-ELISA, 用于检测PRV野毒感染抗体)检测试剂盒, 购自美国IDEXX公司。

1.1.3 主要仪器

瑞森RS-100酶标仪。

1.2 检测方法

采用ELISA检测方法对猪血清中伪狂犬病毒gE(野毒)抗体检测。目前使用猪伪狂犬病疫苗均为gE基因缺失疫苗, 因此通过检测gE基因抗体就能鉴别猪只是否感染过猪伪狂犬病野毒检测仪器为: 瑞森RS-100酶标仪。判断标准: 样品OD值/阴性对照OD平均值 ≥ 0.7 判为阴性, ≤ 0.6 判为阳性, 其它为可疑。

2 实验结果

2.1 伪狂犬病毒感染率

表1为44家规模猪场伪狂犬病毒gE(野毒)抗体检测统计数据: 共检测血清1460份, 检出阳性血清761份, 平均感染率为52.1%。

2.2 不同县区PRV gE抗体差异比较

2.2.1 不同县区2015年与2016年PRV gE抗体阳性率比较

通过与2015年比较, 2016年A区、E市PRV

表1 茂名地区2016年规模猪场猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体ELISA检测结果

县区	养殖场	样品数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)	县区	养殖场	样品数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)
A区	A1	10	0	0.0	D市	D6	10	10	100.0
A区	A2	10	0	0.0	E市	E1	10	0	0.0
A区	A3	10	2	20.0	E市	E2	65	4	6.2
A区	A4	10	5	50.0	E市	E3	10	1	10.0
A区	A5	10	6	60.0	E市	E4	12	2	16.7
A区	A6	10	6	60.0	E市	E5	15	7	46.7
A区	A7	10	6	60.0	E市	E6	12	6	50.0
A区	A8	10	6	60.0	E市	E7	10	6	60.0
A区	A9	15	9	60.0	E市	E8	10	7	70.0
A区	A10	15	11	73.3	E市	E9	12	9	75.0
A区	A11	60	54	90.0	E市	E10	12	9	75.0
A区	A12	10	10	100.0	E市	E11	11	9	81.8
A区	A13	10	10	100.0	E市	E12	12	10	83.3
A区	A14	10	10	100.0	E市	E13	50	43	86.0
B区	B1	10	1	10.0	E市	E14	10	9	90.0
B区	B2	10	4	40.0	E市	E15	12	11	91.7
C市	C1	10	0	0.0	E市	E16	12	11	91.7
C市	C2	10	1	10.0	E市	E17	12	11	91.7
D市	D1	10	0	0.0	E市	E18	11	11	100.0
D市	D2	10	0	0.0	E市	E19	11	11	100.0
D市	D3	751	335	44.6	E市	E20	10	10	100.0
D市	D4	60	31	51.7	合计	44	1460	761	52.1
D市	D5	60	57	95.0					

表2

县别	2015年			2016年		
	采样数(份)	抗体阳性数(份)	平均阳性率(%)	采样数(份)	抗体阳性数(份)	平均阳性率(%)
A区	562	215	38.3	200	135	67.5%
B区	225	57	25.3	20	5	25%
C市	177	2	1.1	20	1	5%
D市	582	282	48.5	901	433	48.1%
E市	822	451	54.9	319	187	58.6%
合计	2360	1007	42.5	1460	761	52.1%

gE 抗体阳性率上升趋势明显。见表2。

2.2.2 不同县区PRV gE 抗体阳性场阳性率区间比较

通过比较, 各个区、市都有被感染的猪场, 阳性场比例较高的是A区、B区和E市, C市和D市相对较好。见表3。

3 结论与分析

3.1 猪伪狂犬病疫情严峻

本次调查44家规模猪场, PRV gE 抗体总体阳性率为52.1%, 猪场感染率为86.4%, 说明茂名地区猪伪狂犬病感染情况较为严重。

表 3 (单位:个)

县别	被检猪场数	感染率为 0 % 猪场数	感染率为 0~20 % 猪场数	感染率为 20.1~50 % 猪场数	感染率为 50.1~100 % 猪场数	场阳性率
A 区	14	2	1	1	10	85.7%
B 区	2		1	1		100%
C 市	2	1	1			50%
D 市	6	2		1	3	66.7%
E 市	20	1	3	2	14	95%
合计	44	6	6	5	27	86.4%

3.2 地域分布

从数据看,不同县区都存在不同程度感染,按照茂名地区的特点,地处山区的 C 市和 D 市相对较好, A 区、B 区、E 市养猪量大,猪场密集,生猪流动也相对频繁,因此, PRV gE 抗体阳性场比例较高,而且 A 区和 B 区阳性率与 2015 年比较还呈上升趋势。

4 防控对策

4.1 加强饲养管理

猪场采样自繁自养原则,引种时必须做猪伪狂犬病毒相关检测,确保引进的为阴性种猪,同时,猪场内部加强血清学监测,发现阳性猪及时隔离饲养或做淘汰处理,逐步把带毒猪清除出去,并建立新的无病猪群。管理上加强鼠类的消灭,还要严格控制犬、猫、鸟类和其他禽类进入猪场,严格控制人员来往,并做好消毒工作^[3]。

4.2 做好免疫工作

目前国内外已研制成功较为成熟的伪狂犬基因缺失疫苗,这些疫苗均能有效地减轻或防止伪狂犬病的临床症状,从而减少该病造成的经济损失。对于阳性场,建议初生仔猪进行滴鼻免疫,因为滴鼻免疫不受母源抗体干扰,同时,伪狂犬病毒遵守“病毒占位规则”,即先到病毒入侵的细胞,其他病毒“无权入侵”,出生当天滴鼻,基因缺失苗中的病毒,抢占了仔猪的呼吸道上皮细胞,隔绝了日后的野毒感染。根据《猪病学》上的描述,母源抗体和一般的免疫(肌注)并不能制止

野毒的入侵,只能在一定程度上限制野毒的复制。可见,净化野毒的第一步,也是最重要的一步就是制止入侵,而滴鼻免疫是制止入侵的最佳手段。当然,滴鼻免疫多应用于新生仔猪的首次免疫,所以注射免疫也是不能缺少的预防措施,猪场要每年做 2~3 次的注射免疫,才能更好的有效的预防该病^[3]。仔猪断尾也是导致伪狂犬病感染的主要原因之一,建议阳性场不要开展断尾工作。本病尚无特效治疗药物,紧急情况下,用高免血清治疗,可降低死亡率。疫苗免疫接种是预防和控制伪狂犬病的根本措施。

4.3 净化方案

可根据广东省农业厅关于猪伪狂犬病的净化方案开展净化工作。母猪每年普免 2~3 次,商品猪群采用“一针滴鼻+二针肌注”的方式,确保猪群保持较高的抗体水平,将带毒猪产生的病毒中和于机体内,不再向外排毒,通过四五年的饲养,当所有阳性种猪逐渐淘汰后,最后达到全场净化的目的,这是目前较为经济的一种猪伪狂犬病净化方法。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997:998-1009.
- [2] 娄高明,杜伟贤.伪狂犬病流行情况及猪场防制策略[J].中国动物检疫,1999,16(5):43-51.
- [3] 潘秋明,陈盛絮.茂名市猪伪狂犬病流行状况调查分析[J].中国畜牧兽医文摘,2017,223(1):127.

深圳南山家禽批发市场冬季禽流感和新城疫抗体监测

段新华, 廖治锋, 黄秀裕

(广东省深圳市南山区动物防疫监督所, 广东 深圳 518052)

摘要:为掌握深圳市南山禽批发市场在禽流感高发期进场鸡只禽流感和新城疫免疫情况, 更好的做好禽流感和新城疫防控, 本研究在2017年1月和2月分4次采集该市场鸡血清共612份, 分别进行H₅亚型禽流感和新城疫抗体测定。结果显示, 该家禽批发市场鸡只H₅亚型禽流感抗体合格率为79.41%, 新城疫抗体合格率为78.43%, 表明该市场鸡禽流感和新城疫免疫抗体水平总体较高, 均达到农业部规定的群体抗体水平 $\geq 70\%$ 的要求, 但是仍然有车次鸡群抗体合格率较低, 甚至无抗体。因此, 动物卫生监督机构有需要进一步加强检疫和监测, 特别是对来自抗体合格率较低地方的鸡只, 要进一步提高监测的数量和频次, 实行严格的市场准入制度, 同时采取相应的动物疫病防控措施, 最大限度的做到对重大动物疫病的防控。

关键词:家禽市场; 禽流感; 新城疫; 抗体检测

中图分类号:S852.65*7 **文献标识码:**D **文章编码:**1005-8567(2017)06-0047-03

禽流感(Avian influenza, AI)是由正黏病毒科A型流感病毒属中的不同亚型引起的能够使鸡、鸭、鹅、鸽子、鹌鹑、野鸟等禽从呼吸系统病变到严重全身性败血症的急性高度接触性传染病^[1-3], 根据致病性禽流感病毒可分为高致病性、低致病性和无致病性^[4]。H₅亚型禽流感属于高致病性禽流感病毒。新城疫(Newcastle Disease, ND)是由新城疫病毒引起的以禽类全身败血症为主要特征的急性、热性、败血性及高度接触性传染病^[5-7], 该病发病急, 死亡率极高, 除沿海和海洋区域外, 广泛分布于世界各地^[8]。家禽中主要引起鸡的感染。H₅亚型禽流感和鸡新城疫均对人与动物危害严重, 严重威胁着养禽业的健康发展, 因此需采取紧急、严格的强制预防、控制、扑灭等措施来处理此类疫病。

深圳市已在2015年7月1日在全市实行“活禽集中屠宰、冷链配送、生鲜上市”, 南山区禽流感和新城疫等重大动物疫病防控重点场所为该区家禽批发市场及市场内设置的家禽代宰点。冬春季节为禽流感和新城疫高发期, 为掌握南山家禽批发市场入场鸡只禽流感和新城疫免疫情况, 以制定

科学合理的防控措施, 笔者于2017年1月和2月分4批次采集该场共612份鸡血清样本, 分别进行H₅亚型禽流感和新城疫抗体测定。

1 材料与方法

1.1 抽样及监测时间

2017年1月和2月, 分4批次随机进行采样, 每批次选取8车次入场鸡, 每车次抽样20份(部分车次样本以实际有效数计)。样品于采集后2日内一次性检测完毕。

1.2 血清样本采集及制备

被检血清随机采集自深圳市南山家禽批发市场的40余个鸡档。使用2.5 mL一次性无菌注射器从鸡只翅静脉采血2 mL左右, 抽血完毕后, 将注射器活塞抽致最大量程, 室温放置2~4小时, 待血清析出后注入1.5 mL离心管, 8000转离心4分钟, 转移上清于另一离心管, 置于-20℃冰箱保存待检。

1.3 检测试剂

禽流感病毒H₅亚型(Re-8)血凝抑制抗原和阳性

收稿日期:2017-11-07

作者简介:段新华(1982-), 男, 硕士研究生, 兽医师, 主要从事动物疫病实验室检测工作. E-mail:289580458@qq.com

血清(批号:2016008和2016002)、鸡新城疫血凝抑制抗原和阳性血清(批号:20160907和20160721)均由哈尔滨维科生物技术开发公司提供。

1.4 检测方法

采用血凝抑制试验(HI),严格按照《高致病性禽流感诊断技术》(GB/T 18936-2003)和《新城疫诊断技术》(GB/T 16550-2008)的规定进行操作。

1.5 结果判定

以完全抑制抑制4个HAU抗原的血清最高稀释倍数作为HI滴度。H₅亚型禽流感HI \geq 4 log₂判定为免疫抗体合格,新城疫HI \geq 5 log₂判定为免疫抗体合格。

2 结果

共检测鸡血清样品612份,H₅亚型禽流感免疫抗体合格率为79.41%,新城疫免疫抗体合格率为78.43%;在免疫合格抗体滴度分布上,禽流感主要分布在4 log₂~8 log₂,新城疫主要分布在6 log₂~10 log₂,新城疫总体免疫抗体滴度较高。抗体监测结果和滴度分布见表1和2。

表1 南山家禽批发市场禽流感、新城疫抗体滴度分布情况

项目	$\leq 3\log_2$	4log ₂	5log ₂	6log ₂	7log ₂	8log ₂	9log ₂	10log ₂
H ₅ 亚型禽流感抗体	126	76	81	140	88	62	29	10
新城疫抗体	80	52	40	67	97	103	74	99

表2 南山家禽批发市场4个批次禽流感、新城疫抗体检测结果

批次	样本数量	H ₅ 亚型禽流感抗体合格率(%)	新城疫抗体合格率(%)
1	157	78.34	77.07
2	135	82.96	100
3	160	74.38	78.75
4	160	82.50	62.50
总体批次	612	79.41	78.43

3 分析与讨论

据统计监测结果,2017年1月和2月份,南山家禽批发市场入场鸡只H₅亚型禽流感和新城疫免疫抗体合格率均达到农业部规定的群体抗体水平 \geq 70%的要求,其中H₅亚型禽流感抗体合格率明

显高于廖治锋等^[9]2006年对该市场878份鸡血清样本检测的69.25%的合格率,远高于陈耀辉等^[10]2006年对深圳市龙岗区三鸟批发市场1760份鸡血清样本49.2%的合格率。所抽取的4个样品批次中,H₅亚型禽流感抗体合格率均达到农业部要求,新城疫则有一个批次不达标(表2)。总的来看,相同数量、同一检测样本H₅亚型禽流感抗体合格率略高于新城疫,但在抗体滴度分布上,新城疫总体滴度较高,且高滴度(8~10log₂)样本数量明显高于禽流感(表1)。说明南山家禽批发市场的入场鸡只禽流感和新城疫免疫情况总体较好,这有利于疫情的防控。但是,仍然有部分车次入场鸡抗体水平不理想,表现为抗体滴度低,甚至无抗体。

监测发现,抗体水平具有车次相关性,相同车次鸡抗体水平大多差异不大;H₅亚型禽流感和新城疫抗体分布同样具有车次相关性,同一车次鸡如果禽流感抗体合格率较高,新城疫大概率也会具有较高的合格率。但是,仍有少部分车次,禽流感和新城疫抗体水平分布不统一,表现为二者只有一种抗体合格,而另一种只有少量抗体合格,甚至无抗体。这表明,不同车次入场鸡因产地、品种、日龄、疫苗质量、免疫程序、免疫技术水平等的不同,免疫抗体水平差异较大;有些虽属同一车次,但由于货主是从不同的养殖场收购,因各养殖场免疫情况不同,而造成免疫抗体水平亦出现明显差异;甚至有些鸡未经过疫苗免疫,或者仅免疫其中一种。

保持较高的抗体水平是预防禽流感和新城疫的关键。家禽抗体水平较低,就容易被感染,进而成为传染源,增加风险和危害。为充分了解入场鸡群禽流感和新城疫等重大动物疫病的免疫情况和抗体水平,南山区动物防疫监督所每年都会根据上级部门要求,并结合实际情况制定年度动物疫病监测计划开展监测,定期对南山家禽批发市场入场家禽进行抽样,对样品同时进行血清学和病原学监测。此外,南山区动物防疫监督所通过实行对入场家禽的严格市场准入制度、水、旱禽分区经营、严格环境卫生消毒和病死禽100%无害化处理制度以及加强对相关从业人员培训等措施,特别是2015年在家禽市场内设立家禽代宰

点, 实行活禽“集中屠宰、冷链配送、生鲜上市”, 确保有效防范禽流感等重大动物疫病的发生和传播。

综上所述, 尽管1、2月份禽流感高发期南山家禽批发市场鸡H₅亚型禽流感和新城疫抗体水平总体达到农业部的要求, 但仍然有20%以上入场鸡抗体水平较低。同时, 由于进入南山家禽批发市场的家禽全部由深圳市外调入, 产地来源复杂、流量大、辐射范围广, 南山家禽市场重大动物疫病防控形式依然严峻。因此, 动物卫生监督机构有应进一步加强检疫和监测, 特别是对来自抗体合格率较低地方的鸡只, 要进一步提高监测的数量和频次, 实行严格的市场准入制度, 同时采取相应的动物疫病防控措施, 最大限度的做到对重大动物疫病的防控。

参考文献:

- [1] 余华, 蔡家利. 禽流感病毒检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(12):78-81.
- [2] Jahangir A, Ruenphet S, Shohma D, et al. Phenotypic, genetic, and phylogeographical characterization of avian influenza virus subtype H5N2 isolated from northern pintail (*Anas acuta*) in Japan [J]. *Virus Research*, 2009, 145(2): 329-333.
- [3] 解林红, 陆绍霞, 李祥, 等. 岳阳地区赤麻鸭禽流感和新城疫的监测[J]. 动物医学进展, 2017, 38(7):134-136.
- [4] Perdue M L, Suarze D L. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that Influence virulence [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000(74):77-86.
- [5] 钱凤芹, 郭宁, 谢先芝, 等. 新城疫基因工程疫苗的研究与应用进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(9):67-69
- [6] 韩春元, 王利勤, 张三东. 一株鸡新城疫病毒陕西分离株F基因的遗传进化分析[J]. 动物医学进展, 2013, 34(11): 51-54.
- [7] 吴延功, 丁国义, 宋翠平. 新城疫的流行特点与防控措施 [J]. 中国家禽, 2012, 34(5): 5-7.
- [8] 丁壮, 尹仁福, 薛聪, 等. 新城疫流行病学新特点及鹅新城疫防控策略[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(1):159-168.
- [9] 廖治锋, 黄小燕, 黄秀裕, 等. 南山区家禽批发市场禽流感免疫抗体水平监测与分析[J]. 养禽与禽病防治, 2007(8): 14-15.
- [10] 陈耀辉, 许春光, 张清. 2016年深圳市龙岗区禽群禽流感免疫水平调查[J]. 养禽与禽病防治, 2007(9):6-7.
- [7] Roscani M G, Polegato B F, Minamoto S E, et al. Left ventricular sphericity index predicts systolic dysfunction in rats with experimental aortic regurgitation [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2014, 116: 1259-1262.
- [8] Plante E, Lachance D, Beaudoin J, et al. Comparative study of vasodilators in an animal model of chronic volume overload caused by severe aortic regurgitation [J]. *Circulation: Heart Failure*, 2009, 2:25-32.
- [9] 孙妍, 王建德, 李晓妮, 等. 超声心动图引导建立小型猪主动脉瓣反流模型的方法学研究[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(5):495-498.
- [10] 王萧, 董浩然, 麦细焕, 等. 主动脉瓣关闭不全法建立新西兰兔心衰模型[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2):127-131.
- [11] 龚宝勇, 杨镇宇, 刘晓霖, 等. 噶拉嗪和氯胺酮复合麻醉对蕨麻小型猪血压和脉搏的影响研究[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, 41(6): 24-26.
- [12] 潘金春, 闵凡贵, 王希龙, 等. 实验用蕨麻小型猪血液生理生化指标测定及分析[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(6):81-83.

上接第39页

动物免疫抗体监测工作中存在的问题及建议

龚伟宏

(惠州市动物卫生监督所, 惠州市动物疫病预防控制中心, 广东 惠州 516001)

摘要:动物免疫抗体监测工作是为了保证动物免疫效果, 可以准确掌握疫情的实际情况, 是当前免疫评估的主要手段。监测工作有着非常重要的意义, 能对动物疫情风险进行控制, 也能为疫情的防控工作提供科学执行依据。本文针对动物免疫抗体监测工作中存在的问题, 提出了相应的对策与建议。

关键词:免疫抗体监测; 问题; 建议

中图分类号:S852.4+3 **文献标识码:**D **文章编码:**1005-8567(2017)06-0050-02

基于动物疫控中心的确立, 人们更重视动物免疫抗体监测工作。在实际工作中, 实现有效的监测工作, 尚存在问题, 影响动物的健康发展。因此, 本文对其存在的问题进行了思考, 并提出了解决措施。

1 动物免疫抗体监测工作中存在的问题

第一是监测样品的采集存在较大困难。主要原因是一些养殖户对动物免疫抗体监测的意义不了解, 认为采血是没有必要的^[1];一些养殖户认为采血对动物不利, 反而会增加疾病风险;养殖户心疼动物, 不忍心采血;采血技术人员操作不规范, 延长采血时间, 导致一些农户不愿意配合等等, 这些因素导致工作开展难度大。

第二是上报的数据缺乏真实性和有效性。受多方面原因的影响, 上报的数据存在较大差异, 数据更新滞后, 影响动物免疫抗体监测工作的有效开展。同时, 在疫病防控中心上报的数据, 由于其数据量较大, 导致期间出现严重的浪费现象。

第三是动物免疫抗体监测工作在实际开展期间, 要投入一定的经费。因为动物免疫抗体监测工作为专业性较高的技术工作, 需要养殖户配合, 也要技术人员对其积极操作, 期间会消耗大量的人力、物力、财力等。如果没有对养殖户提供补助或经费, 会制约该工作的积极发展。

第四是实验室监测能力较弱。当前, 县级的动物免疫抗体监测中心存在较大限制, 其中病原学、细菌病、寄生虫病等病种未得以开展。同时, 对仪器设备提出更高要求, 需保证监测数据准确性, 从而保证动物免疫抗体监测工作的有效开展。因此, 提高实验室的监测能力, 是保证本项工作的有效执行的条件之一^[2]。

2 动物免疫抗体监测问题的解决建议

2.1 开展多种方式的宣传工作

基于广播、电视等多媒体方式进行宣传, 使养殖人员认识到动物免疫抗体监测工作的重要性, 保证各个养殖户和相关部门支持该工作的实施, 以维护动物免疫抗体监测工作的积极开展。在实际工作中, 需要按照一定要求对样品进行采集, 保证监测结果的可靠性, 以提高地区的动物免疫抗体监测工作质量^[3]。

2.2 加大培训力度

对工作人员进行培训期间, 需要重点培训基层人员。在实际中, 不仅要重点提升技术员的采血技术水平, 还要培训养殖户合理应用动物免疫方法, 结合疫病诊断, 优化免疫程序, 保证提供出合理的数据参数。同时, 针对动物免疫抗体监测工作中的不合理因素, 分析原因, 并在实践工作中总结经验, 促进免疫操作工作的严格执行, 以

收稿日期:2017-10-17

作者简介:龚伟宏(1981-), 男, 广东惠州人, 检验技术员, 主要从事动物检验检疫工作. E-mail:2840559951@qq.com

维护动物免疫抗体监测工作的有效执行。

2.3 保证信息的准确性和及时性

第一，相关部门需要实现信息共享化，及时分析养殖户的各个情况。第二，血样采集过程中，规范填写表格。针对已采集的样品，进行实验室分析，将实验结果告知养殖户，指出其问题并指导免疫方法，以达到监测的目的。

2.4 增加监测费用投入

为县级的实验室投入资金，保证可以购置精良的设备，以促进动物免疫抗体监测工作的顺利实施。为基层工作人员投入经费，增强其工作积极性，保证其主动参与到动物免疫抗体监测工作中。建立严格的考核工作，预防不规范行为，提升动物免疫水平。基于我国的积极政策，为养殖户提供更多支持，这样不仅能激发工作人员积极性，也能促进动物免疫抗体监测工作的有效开展。相关部门要为养殖户提供补贴，对其积极引导，促进服务工作的优化进行，减少工作开展的压力，更有效的完成动物免疫抗体监测工作^[4]。

2.5 提高实验室监测能力

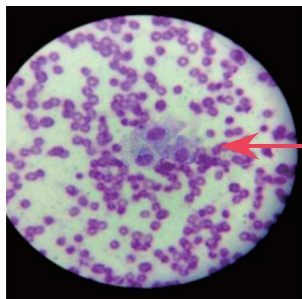
实验室工作人员的监测能力需提高。加大力度对涉及病原学、细菌病、寄生虫病等方面工作人员的培训，为实验室投入经费，优化实验室仪器设备，规范实验室的检测的安全性和标准性，为动物免疫抗体监测工作提供支撑条件。

3 小结

通过对动物免疫抗体监测工作存在的问题进行分析，提出了解决问题的改进建议，以期动物免疫抗体监测工作的执行提供参考。

参考文献：

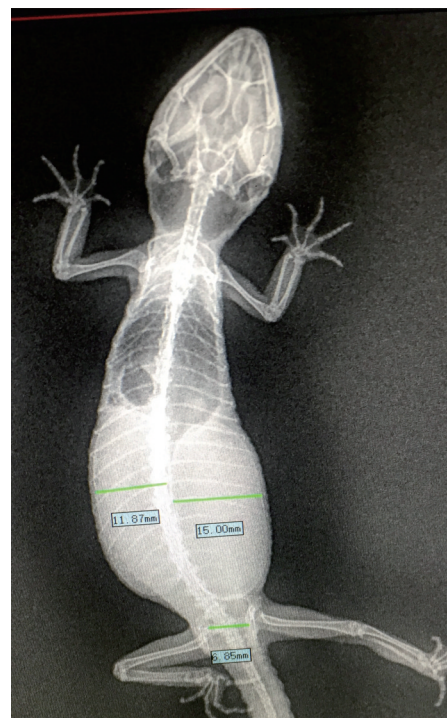
- [1] 陈引桂. 动物免疫抗体监测工作中存在的问题和建议[J]. 大科技, 2015(3):251-251, 252.
- [2] 杨晓梅. 浅析动物免疫抗体监测在养殖合作社中的重要作用[J]. 兽医导刊, 2015(18):31-32.
- [3] 姚亚东. 动物免疫抗体监测的意义及措施[J]. 甘肃畜牧兽医, 2016, 46(7):18-19.
- [4] 肖潇, 曾凉雄, 覃丽, 等. 安居区2015年几种重大动物疫病免疫抗体监测结果和评估分析[J]. 兽医导刊, 2015(24): 130-131.



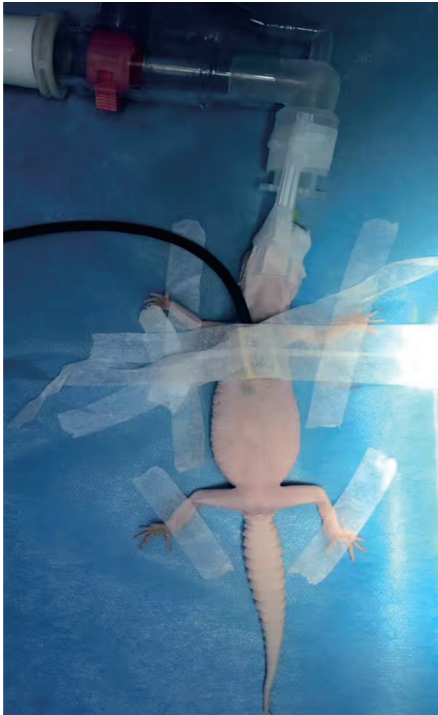
周红蕾图1 肉瘤细胞



周红蕾图2 影像学检查结果



罗声扬图1 X光图



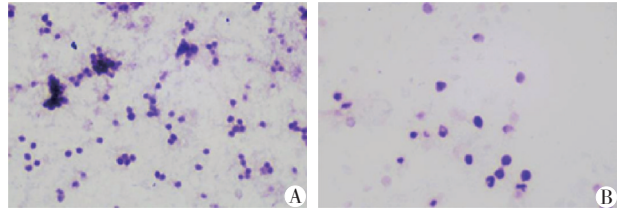
罗声扬图2 术前固定



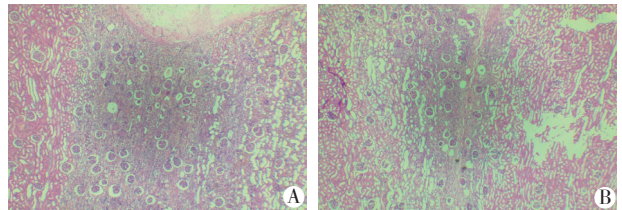
罗声扬图3 输卵管



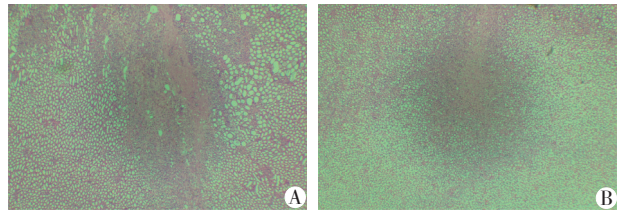
罗声扬图4 缝合及巨型蛋



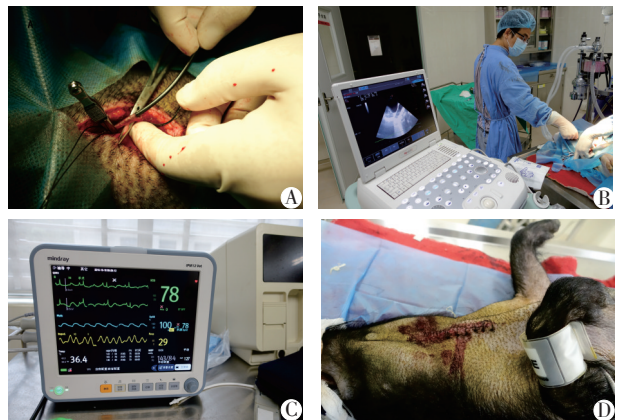
林贤康图3 尿沉渣镜检, A为术后第1天;B为术后第3天



林贤康图5 皮质切口处的组织切片, 10×目镜, 4×物镜下视野



林贤康图6 髓质切口处的组织切片, 10×目镜, 4×物镜下视野



注:A:分离暴露右颈总动脉,并置入10F套管;B:超声引导下穿刺主动脉瓣;C:监护术中动物体温、血氧、心电、血压等等指标;D:术后缝合创口

龚宝勇图1 经右颈总动脉主动脉瓣关闭不全动物模型建立