

双月刊 1976年3月创刊

第39卷第6期 (总第178期)

2014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

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 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 林旭桢 李 岩

陈瑞爱 罗满林 黄旭钊 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdxmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



**本刊声明:**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。本刊将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·

- 支原体表面蛋白的相变与抗原变异机制..... 胡美容, 周燕芬, 等(1)
- 鸡蛋中兽药残留形成过程及防控措施分析..... 李亚男, 白景英, 等(7)
- 猪胎衣的主要成分及其应用进展..... 王 琪, 吴传文, 等(12)
- 黄芪多糖在肉鸡养殖业上的应用..... 刘瑞生(15)

### ·畜牧技术·

- 当前我国禽蛋生产形势分析及后期走势研判..... 虞 华, 彭 莉(19)
- 如何提高平养肉种鸡的受精率..... 韩文格(22)

### ·兽医临床·

- 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗与灭活疫苗的免疫效果评估试验..... 刘承军, 王海丽, 等(24)
- 生猪漂白粉中毒的病理变化观察..... 彭南秀, 肖 杰, 等(26)

### ·试验研究·

- 广东地区近2年禽流感H<sub>9</sub>亚型HA基因的序列分析..... 卢受昇, 高慧敏, 等(29)
- 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗病毒培养条件的优化..... 周靓靓, 孙 心, 等(33)
- 鸭瘟病毒PCR快速检测方法的建立..... 于新友, 李天芝, 等(36)

### ·华南宠物园地·

- 一例犬髌骨双侧性内方脱位的诊断与治疗..... 任 婧(39)
- 一例犬类固醇反应型脑炎-动脉炎的临床病例报告..... 李晋飞, 薛 剑, 等(42)
- 自发性Beagle犬前列腺增生模型的建立..... 胡敏华, 龙海斌, 等(45)

### ·经验交流·

- 湘村黑猪选育中的疫病防控措施..... 胡百文, 刘 建, 等(47)
- 浅析荧光PCR检测出现假阳性和假阴性的原因..... 黄露茜, 杨瑞龙, 等(50)

### ·信息之窗·

- 2014“永顺杯”优秀论文评选启事..... (11)
- 欢迎订阅本刊..... (44)
- 2014年(总第173-178期)目次..... (52)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Dec.2014 Volume 39,Number 6 (Total No.178)

---

## Main Content

- Mechanisms of Phase Transformation and Antigenic Variation of Surface Protein in Mycoplasma* .....  
.....Hu Meirong,Zhou Yanfen, et al(1)
- Formation, Prevention and Control of Veterinary Drug Residues in Eggs* .....  
..... Li Yanan, Bai Jingying, et al(7)
- Main Components and Utilization of Porcine Afterbirth* ..... Wang Qi,Wu Chuanwen,et al(12)
- Utilization of Astragalin in Chicken Production* ..... Liu Ruisheng(15)
- Current Situation and Trends of Egg Production* ..... Yu Hua,Peng Li(19)
- Evaluation of Highly Pathogenic PRRS Attenuated Vaccine and Inactivated Vaccine* .....  
..... Liu Chengjun,Wang Haili,et al (24)
- Pathological Change of Pig with Chlorinated Lime Toxicosis* .....Peng Nanxiu,Xiao Jie,et al(26)
- Analysis of Hemagglutinin Genes of Avian Influenzavirus H9 Subtype Isolated from Guangdong Area in  
2013–2014* .....Lu Shousheng, Gao Huimin, et al(29)
- Optimization of Cultivation Process of Swine Transmissible Gastroenteritis Virus and Epidemic  
Diarrhea Virus*.....Zhou Liangliang,Sun Xin,et al(33)
- One-step PCR Assay for Detection of Duck Plague Virus* ..... Yu Xinyou, Li Tianzhi, et al(36)
- Diagnosis and Treatment of Bilateral Patellar Dislocation in Canine* .....Ren Jing (39)
- A Case of Steroid-responsive Meningitis-arteritis in Canine* ..... Li Jinfei,Xue Jian, et al (42)
- Animal Model of Spontaneous Prostatic Hyperplasia in Beagle Dog* .....Hu Minhua,Long Haibin,et al(45)
- Disease Prevention and Control in Breeding of Xiangcunhei Swine* ..... Hu Baiwen,Liu Jian,et al (47)
- Causes of False Positive and False Negative in Fluorescence PCR Detection* .....  
..... Huang Luhan,Yang Ruilong,et al(50)



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

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

# 支原体表面蛋白的相变与抗原变异机制

胡美容, 周燕芬, 张震, 齐冬梅\*

(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

**摘要:** 支原体基因组非常精简, 由单一的细胞膜包裹, 缺乏细胞壁, 是目前所知能独立生活、自我复制的最小微生物。但是, 这种最小的原核生物即便存在特异性免疫应答的情况下也能引起多种宿主持续性感染。支原体能在宿主体内适应和生存很重要的一个原因是: 大量基因家族发生频繁随机的基因表型突变, 这些遗传变异改变了大量表面蛋白的表达、大小及抗原结构, 导致在一个克隆群里产生大量功能和形态各异的表型。这一现象为这些无细胞壁的病源体提供了一种逃避宿主免疫应答的方式, 并通过改变细胞表面形态来隐藏或暴露那些对宿主间相互作用和生存至关重要的抗原成分。

**关键词:** 支原体; 表面多样性; 抗原变异; 免疫逃避

**中图分类号:** S852.43

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0001-06

支原体是能独立生活、自我复制的最小生命体, 具有微小的细胞结构, 缺乏细胞壁, 代谢途径比较匮乏, 而且基因组比较精简。大多数支原体是人类和动物的病原体, 常引起慢性感染, 但并不致死。这些简单的细菌营寄生生活, 且与宿主亲密接触, 常定居在呼吸道和生殖道粘膜表面。

像其他许多营寄生生活的细菌一样, 支原体为了适应生存也要面对复杂的宿主环境。许多古典细菌已进化获得了一些机制用于对抗和适应不断变化的恶劣环境, 其中一种重要的基因调控机制是通过反馈通路激活或抑制关键基因来改变表型, 其缺陷在于特异性强, 对新条件并不适用<sup>[1]</sup>。这种系统经常涉及一连串级联反应, 调控基因在基因组中占很大比例, 这一调控方式在支原体中并不存在。另一种机制是通过高频随机突变来产生种群突变体, 以保证至少有一个突变体能在特殊环境中生存下来<sup>[2,3]</sup>。这种机制的主要缺点是需要复杂的维持和修复系统, 以便阻止必需基因的致死性突变。这在支原体中亦不存在。

对支原体而言, 主要是通过快速可逆的基因改变来实现遗传变异, 这一改变可使同一种群产生大量不同的细胞表面标志突变体。为了实现这一目的, 支原体进化获得了大量基因重组机制, 直接导致主要表面组分产生相变和抗原变异。这

样, 当面对未知挑战时, 某种突变体就有可能存活下来<sup>[4]</sup>。

由于缺乏细胞壁, 支原体细胞膜表面组分在感染过程中起着关键作用, 除了介导营养物质的转运外, 还参与与宿主细胞相互作用以及抵御宿主免疫反应等作用。因此, 掌握支原体的相变和抗原变异的机制对于有效监测支原体感染动态大有裨益。

在本综述中, 支原体的遗传变异系统涉及一些相互关联的多基因家族和高频表面变异体的遗传机制, 并讨论这些机制在支原体感染过程中的生物学意义。

## 1 表面蛋白的相变和抗原变异调控机制

支原体具有大量复杂的调控系统, 能通过功能相关的表面脂蛋白多基因家族的遗传变异机制产生高频突变的表面突变体<sup>[4,5]</sup>(见表1)。迄今为止, 已发现两类 ON/OFF 分子开关。一类是 DNA 滑动机制, 主要通过简单序列重复区内的核苷酸插入或缺失来实现突变; 另一类主要通过点特异性重组酶进行的 DNA 重排。

DNA 滑动机制在猪鼻支原体中被首次报道<sup>[6]</sup>。这种机制由 3~8 个基因组成, 位于同一染色体上, 能在细胞表面大量表达几种相关的脂蛋白, 这种脂蛋白命名为 Vlp<sup>[7,8]</sup>。每个 vlp 基因代表一个

表 1 调控支原体表面蛋白相变和抗原变异的主要机制 (Citti C 等, 2010)

变异类型	遗传机制	支原体种类(基因家族)
ON/OFF 分子开关	启动区内单个重复序列的 DNA 滑动	<i>M. hyorhinae</i> (vlp)
		<i>M. gallisepticum</i> (vlhA)
		<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> (vmc)
	点特异性重组(基因重排)	<i>M. pulmonis</i> (vsa)
		<i>M. bovis</i> (vsp)
		<i>M. agalactiae</i> (vpma)
点特异性重组(启动子的倒置)	<i>Ureaplasma parvum</i> (mba)	
	<i>M. penetrans</i> (mpl)	
大小变异	编码区内段序列的直接重复	<i>M. agalactiae</i> (vpma)
		<i>M. hyorhinae</i> (vlp)
		<i>M. pulmonis</i> (vsa)
		<i>M. bovis</i> (vsp)
		<i>Ureaplasma urealyticum</i> (mba)
结构域的移动	基因转换(单向)	<i>M. synoviae</i> (vlhA)
	相互重组	<i>M. genitalium</i> (mgp)
	DNA 重组	<i>M. agalactiae</i> (vpma)
		<i>M. bovis</i> (vsp)
其他	基因或位点的复制	<i>M. agalactiae</i> (vpma)

CDS: 编码序列; SSR: 单个重复序列。

转录单位, 在启动子 -35 到 -10 序列区含有一个 polyA 尾。当 polyA 尾长度为 17 bp 时, 下游的 vlp 才被转录和翻译。单个碱基的插入和缺失足以引起 vlp 转录终止, 这极可能是因为 polyA 维持了启动子区 DNA 的高级结构, 这一结构对转录起始至关重要<sup>[6]</sup>(图 1A)。总之, 这种遗传机制提供了一种有效的 ON/OFF 开关, 能够以不同的方式独立地操纵每一个 vlp 基因, 导致在种群繁殖时, vlp 家族处于动态表达, 如一个细胞可以表达一种或任意一组 vlp 产物<sup>[4]</sup>。在鸡毒支原体中也存在一种类似的调控系统: vlhA 多基因家族。该家族约含 40 个相关的脂蛋白基因, 分布在几个基因簇中<sup>[9]</sup>。vlhA 的相变也是通过转录水平进行调控。不同的是, 突变发生在一个重复的 GAA 基序中, 这个基序位于单个的 vlhA 基因启动子的 5' 末端, 也就是启动子上游的 -35 区域。当 GAA 重复序列为 12 时, 下游的 vlhA 基因可被转录, 具体机制并不像 vlp 系统研究得那么清楚。目前的所有已知机制尚不能解释该支原体如何调控仅表达一种 vlhA 基因的现象<sup>[8, 10]</sup>。

第二类分子开关是 DNA 重排, 如切割-粘贴机制, 利用点特异性重组酶将功能性启动子下游的沉默结构基因进行表达。牛型支原体 vsp、鼠肺支原体 vsa 和无乳支原体 vpma 等系统均采用这样变异方式<sup>[11-13]</sup>。所有这些系统都具有点特异性重组酶, 他们能够识别位于每个可变基因上游的一段特异性短序列, 这段序列即为 DNA 重排的靶序列。有研究显示: 将无乳支原体 vpma 基因簇邻近的 xer1 重组酶基因敲除后, vpma 相变现象不再出现<sup>[14]</sup>。

最近报导最多的是第三种遗传机制, 即通过结构域的移动产生抗原变异(图 1C)。如滑液支原体通过高频率的单向基因重组<sup>[15]</sup>, 生殖支原体通过可逆的基因重组来产生抗原变异<sup>[16, 17]</sup>。滑液支原体的 vlhA 家族是由单个的 vlhA 基因, vlhA 基因同系物以及一些缺乏 5' 末端编码序列的拟基因组成。滑液支原体产生大量的抗原变异是因为在整个功能性 vlhA 基因和拟基因之间发生了单向重组, 以及拟基因序列的重叠还有就是在已表达的基因相应序列的缺失<sup>[15]</sup>。与鸡毒支原体不

同的是(在鸡毒支原体中 *v1hA* 基因分布在基因组中几个区域), 滑液支原体 *v1hA* 表达基因和拟基因被局限在一个 114kb 的区域, 表明这个系统相对比较接近, 可能产生位点特一性重组<sup>[18]</sup>。人类生殖支原体就是采用这种方式来产生抗原多样性。该支原体基因组含有大量的 *MgPar* 重复序列, 这个序列与 *mgpB*, *mgpC* 两个基因有同源性, 而这两个基因编码免疫原性的粘附蛋白。到目前为止, 这种机制在细菌中是独一无二的, 在这个机制中能通过 *mgpB*, *mgpC* 以及 *MgPar* 供体序列之间的相互重组来产生高频率的抗原变异<sup>[16,17]</sup>。与滑液支原体情况不同的是, *MgPar* 序列是分布在几个抗原决定簇里, 而这几个抗原决定簇是分散在染色体上的。目前还不知道在两种支原体毒株中可变基因结构的不同是否反映单向和双向重组的遗传机制。

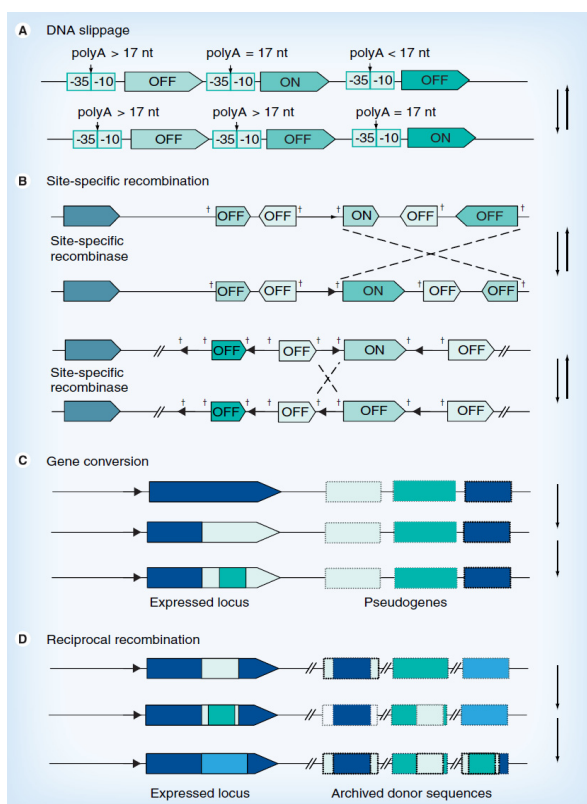


图1 调节支原体表面蛋白高频率相变和抗原变异的主要遗传机制(Citti C等,2010)

(A)DNA滑动机制的ON/OFF分子开关。以猪鼻支原体的 *v1p* 基因为例, 每个 *v1p* 基因代表一个转录单位, 在启动子 -35 到 -10 序列区含有一个 polyA 尾。当 polyA 尾长度为 17bp 时, 下游的 *v1p* 才被转录和翻译, 长度大于或小于 17bp 时, 下游的 *v1p* 基因

终止转录。(B)DNA重排这种分子开关。以无乳支原体的 *vpma* 系统为例, 这个系统具有点特异性重组酶, 在每个可变基因上游有一段特异性短序列, 即为它的靶序列。当特异性位点被识别后, 能催化 DNA 发生重排。(C)大量的抗原变异以单向基因重组得以实现, 如滑液支原体的 *v1hA* 家族, 就是通过功能性的 *v1hA* 基因与它临近的拟基因发生单向重组来产生大量的抗原变异。(D)抗原变异还可以通过基因的相互重组产生, 如生殖支原体的 *mgp* 基因, 它的变异就是通过 *mgp* 的表达区序列和散布的染色体上的 *mgp* 供体序列相互重组而产生的。

注: 大箭头表示基因编码序列; 箭头表示启动子(A图除外); 虚线表示DNA倒置; †表示重组酶识别的短序列。

## 2 遗传因素对支原体表面变异起重要作用

大部分变异成分由多基因家族编码, 位于支原体表面, 能刺激宿主产生强烈的体液免疫应答。这些多基因家族中的基因序列都含有一段信号肽, 在信号肽的 N 端都随带一个脂质框, 且基因序列中其他编码氨基酸的成分可以被家族的其它成员直接复制或共享。

无乳支原体的 *vpma* 家族的图谱能解释这些结构特征<sup>[13,19]</sup>(图2)。图上3种菌株的所有成分全部按顺序列出, 表明这种支原体含有18种不同的 *vpma* 产物。成熟的 *vpma* 产生的主要氨基酸序列提示有几种类型的遗传机制有助于产生抗原多样性以及时相变异性, 其中一种遗传机制是在 C 端延伸或缩短。可能是通过一个短的 DNA 连续重复序列的滑动来实现的, 这可以从等位基因 *vpmaD* 或者 *vpmaF* 的图谱来得到证实。这种遗传机制的结果是使某些变异产物的大小发生改变, 而且已报导有一些支原体基因如猪鼻支原体的 *v1p*、肺支原体的 *vsa*、牛支原体的 *vsp* 都存在这种变异系统。在鸡毒支原体中, 这种变异的频率还不明确, 但是在猪鼻支原体的克隆群中单个的 *v1p* 大小变异发生的频率是很高的。另一种影响 *vpma* 结构的变异的遗传机制可能是基序的改变。通过比较 *vpmaU*、*vpmaZ* 和 *vpmaV* 的主要氨基酸序列可以看出变异最有可能是通过同源重组。还有一种促成表面多样性的变异机制是基因重叠, 随后抗原发生漂移, 从而产生同系物或者是新的产物。例如, *vpmaD1*、*vpmaD2* 和 *vpmaI* 最有可能是基因重叠和突变的产物, 从而使同样的基因 *vpmaD1*、*vpmaD2* 以及 *vpmaI* 的大小发生变化。

在支原体系统中已发现菌株之间可变基因组

成分不同,产生抗原多样性水平也不一样。在无乳支原体 5632 菌株中,第二个抗原决定簇含有 7 个 Vpma 重复基因,它可能有 91 种 vpma 成分,与只含有 6 个 vpma 基因的经典株相比,表面多样性显著增加,而且可变基因主要改变株系之间而不是株系内部的多样性<sup>[19]</sup>。

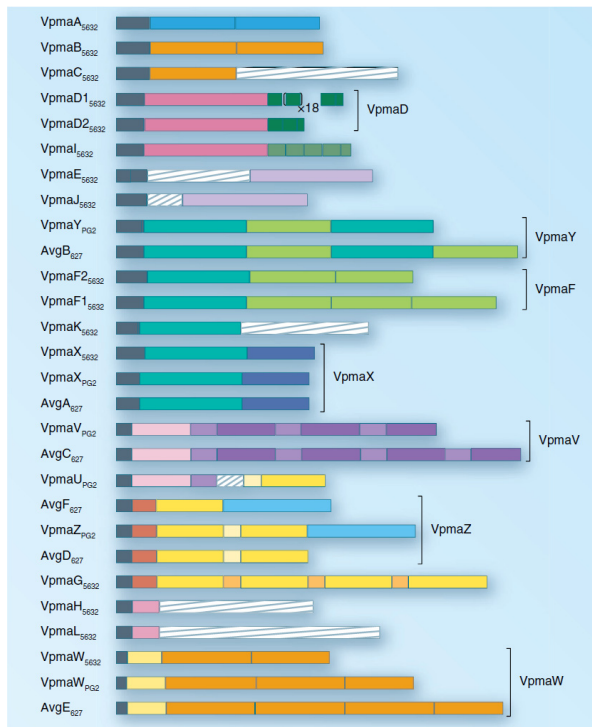


图2 产生无乳支原体 Vpma 变异产物的镶嵌型结构 (Citti C 等,2010)

注:柱状图示表示完整的 vpma 序列(不包含信号序列),相似的氨基酸可能在一个 vpma 基因中重复出现或者出现在其他的 vpma 基因中,阴影线部分表示单一序列。无乳支原体 3 个菌株的 vpma 成分已被成功测序,即 PG2, 5632, 还有一个分离株 627, 其中 627 中的 vpma 被命名为 avg。从核苷酸的差异上分析,这 3 种菌株的 vpma 成分构成了 28 种 vpma 基因。从主要的氨基酸来看,有 18 种 vpma 产物,这 18 种等位基因有的只存在一个菌株中,如 vpmaD, I, F; 有的在两个菌株中都出现,如 vpmaY 和 V; 有的在 3 种菌株中都含有,如 vpmaX, Z 和 W。

总之,支原体能产生大量表面抗原多样性,是由于随机突变和复杂的遗传机制(如 ON-OFF 开关、大小变化、结构变异;更罕见的是,基因复制和基因缺失)导致的,从而形成这种复杂的组合方式(见图 3)。对于这篇综述中所阐述的大部分体系来说,通过一种特殊的体系所形成的突变体的量

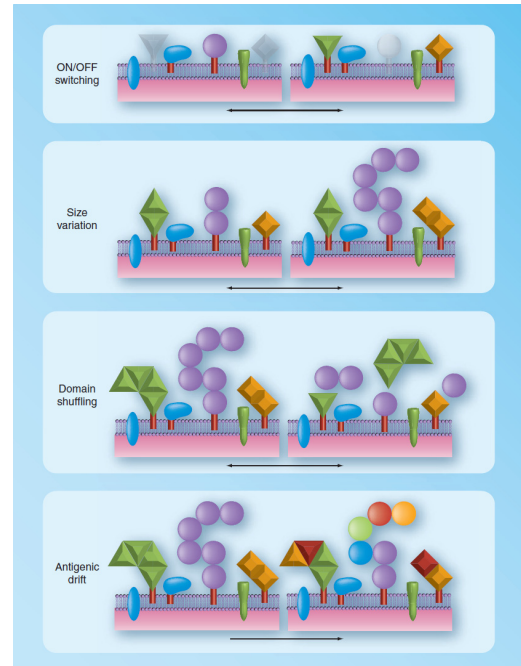


图3 支原体的抗原变异(Citti C 等,2010)

是很难被评估的,预期量非常高。例如,在拥有大约 40-70 v1hA 拟基因的滑液支原体中,估计形成超过  $10^5$  个 v1hA 突变体<sup>[20]</sup>。另外,在生殖支原体中,尽管它的基因组很小,但是基因组有 4% 的 MgPar 重复序列,估计它能形成无数个突变体<sup>[17]</sup>。

影响支原体表面主要抗原的变异机制。ON/OFF 转换过程是由于支原体菌群主要抗原的突变频繁发生(10-2-10-5/细胞/代)的结果。这种形式的突变涉及一些脂蛋白基因的无序表达。脂蛋白 C 端结构域的调整导致细胞表面蛋白长度的改变,这是支原体抗原突变的另一种常见机制。ON/OFF 转换和表面脂蛋白大小的变化参与调节支原体和宿主环境之间相互作用的屏蔽/暴露过程。其他能够使支原体表面产生多样性的机制包括结构域重排和抗原漂移。结构域重排是基因家族内发生 DNA 重组的结果,而抗原漂移是脂蛋白氨基酸序列变化累积的结果。除抗原漂移外,其余 3 种突变发生的频率均很高。

### 3 支原体表面变异的生物学意义

支原体通过信号肽的加工,脂质的包裹,发育成熟及相变,使得抗原变异产物完全地暴露在细胞表面。由于缺乏细胞壁,它与宿主环境紧密接

触。有趣的是,表面成分高频率的时相和大小变化只在能够繁殖的免疫活性宿主中产生。有研究者推测这种现象有利于逃避宿主的免疫反应。

抗原变异有利于逃避宿主的免疫反应,这点可以从猪鼻支原体的实验中得以证实<sup>[21]</sup>。从1头感染过的猪收集的血清能抑制猪鼻支原体克隆变异株的生长,它只表达一段短的 vlp,而相同的那段长的 vlp 序列则被抑制,这种现象不依赖于补体的存在也不依赖于典型的 vlp 支原体表达系统。敏感菌株在有猪鼻支原体抗体的存在下进一步繁殖是通过突变体的选择过程来实现的,它选择一些能表达长片段 vlp 且有抵抗力的种群。Vlp 抗体表现型的出现主要是依靠多种突变途径,以致于能够快速表达长片段 vlp。根据亲本的遗传学背景,这些突变途径不是倾向于表达沉默的长片段 vlp 基因就是增加短片段 vlp 的复制数量,以延伸相应 C 端的产物。详细分析显示 vlp 基因不是抑制作用的最终目的,长片段 vlp 好像是为了掩饰一些重要的,至今还不知道的成分。

一些研究表明支原体这些复杂的突变系统在逃避宿主免疫应答中有遗传学作用。在鼠原肺炎支原体中,vsa 基因家族由于点特异性重排而使某个时相发生变化,尤其是利用 T 细胞和 B 细胞有缺陷的野生型小鼠的实验表明适当的免疫应答对 vsa 有选择压力<sup>[22]</sup>。另外,从女性生殖支原体的 mgpB 和 mgpC 序列的暂时性抗原变异来看,持续感染与宿主免疫选择压力下的突变体是一致的<sup>[16]</sup>。

已有实验指出肺炎支原体 vsa 大小的变异在某些生物学进程中有重要作用,更准确的说,肺炎支原体由少量串联重复的 C 端构成的短片段 vsa 产生的变异体其生物膜能够吸附红细胞,补体能有效地使其失活,但是长片段的 vsa 没有这些特性<sup>[23]</sup>。由于缺乏细胞壁以及丰富的相关脂蛋白,支原体通过性质、大小和组成成分的多样性提供一个灵活的保护屏障,这样能够隐蔽和暴露其他固定的成分,可以快速改变表面的敏感性,从而改变表面组织的厚度。在这篇综述中,高度变异的脂蛋白家族通过一系列的随机变异和选择过程,能够调节支原体表面,宿主细胞以及宿主外界环境的相互作用。除了逃避宿主免疫应答和调节表面敏感性这些非特异性作用以外,还有能够特异性地

吸附宿主细胞的附加功能,如牛支原体 Vsp。但是,Vsp 的特性是否与支原体能在特异的宿主体内繁殖有关却不得而知<sup>[24]</sup>。

#### 4 结论

许多支原体菌株能感染广泛的宿主,甚至在有特异性免疫应答的存在下也能引起慢性疾病,这些持续感染表明这种简单的病原体与其宿主的相互作用远比我们预期的要复杂得多。支原体能够在宿主体内繁殖和生存可能与许多复杂的遗传系统有关,从而可以快速改变表面抗原。这些复杂的系统影响许多表面脂蛋白的表达和结构均具有随机性,突变体以  $10^{-2}$  到  $10^{-5}$  的概率自发形成。某些研究表明这种高度的表面变异性是支原体逃避宿主免疫应答而进化形成的一个非常重要的策略,所以许多支原体疫苗在试验时会出现令人扫兴的结果,支原体高频率的抗原变异就是造成其预防措施复杂的一个关键因素。支原体是最简单的能自我复制的生命体,由单层细胞膜包裹着精简的基因组,表面结构的可塑性可能不仅是阻碍免疫应答的一种方式,也可能是构成表面易趋性的一个球形的,随机的调节器,从而随机地隐藏或暴露其表达成分(有些成分可能对支原体的生存起关键作用)。支原体表面结构动态的表型变更可能弥补了其缺乏调节系统的不足,使其能隐藏和暴露那些与宿主细胞相互作用的分子(例如,细胞粘附素)<sup>[25]</sup>。从上述几个方面来看,支原体出现的相变和抗原变异对它的感染过程起关键作用。

细菌的快速相变,大小和抗原变异的随机性都表明有必要在天然环境中再次验证这些系统。在稳态条件下,既定的变异系统将会以恒定的频率来产生变异体。内在机制是否会因为外界环境的改变而进行调节这个问题对支原体的分析非常重要。

支原体的遗传系统表明高频率的抗原变异和宿主免疫系统已共同进化,宿主的免疫应答是否有助于支原体最适突变体的选择已成为目前一个非常有趣的问题。

#### 参考文献:

- [1] Rambow-Larsen A A, Petersen E M, Gourley C R, et al. *Brucella* regulators: self-control in a hostile envi-

- ronment[J]. Trends Microbiol, 2009, 17(8):371-377.
- [2] Moxon R, Bayliss C, Hood D. Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation[J]. Annu Rev Genet, 2006(40):307-333.
- [3] Van Der Woude M W, Baumlér A J. Phase and antigenic variation in bacteria [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(3):581-611.
- [4] Citti C, Nouvel L X, Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas[J]. Future Microbiol, 2010, 5(7):1073-1085.
- [5] Rosengarten R, Citti C, Glew M, et al. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes [J]. Int J Med Microbiol, 2000, 290(1):15-25.
- [6] Citti C, Wise K S. Mycoplasma hyorhinis vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins[J]. Mol Microbiol, 1995, 18(4):649-660.
- [7] Citti C, Watson-Mckown R, Drosesse M, et al. Gene families encoding phase-and size-variable surface lipoproteins of Mycoplasma hyorhinis [J]. J Bacteriol, 2000, 182(5):1356-1363.
- [8] Liu L, Panangala V S, Dybvig K. Trinucleotide GAA repeats dictate pMGA gene expression in Mycoplasma gallisepticum by affecting spacing between flanking regions[J]. J Bacteriol, 2002, 184(5):1335-1339.
- [9] Papazisi L, Gorton T S, Kutish G, et al. The complete genome sequence of the avian pathogen Mycoplasma gallisepticum strain R (low) [J]. Microbiology, 2003, 149(Pt 9):2307-2316.
- [10] Liu L, Dybvig K, Panangala V S, et al. GAA trinucleotide repeat region regulates M9/pMGA gene expression in Mycoplasma gallisepticum [J]. Infect Immun, 2000, 68(2):871-876.
- [11] Lysnyansky I, Ron Y, Yogev D. Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in Mycoplasma bovis [J]. J Bacteriol, 2001, 183(19):5698-5708.
- [12] Shen X, Gumulak J, Yu H, et al. Gene rearrangements in the vsa locus of Mycoplasma pulmonis [J]. J Bacteriol, 2000, 182(10):2900-2908.
- [13] Glew M D, Marendra M, Rosengarten R, et al. Surface diversity in Mycoplasma agalactiae is driven by site-specific DNA inversions within the vpma multigene locus [J]. J Bacteriol, 2002, 184(21):5987-5998.
- [14] Chopra-Dewasthaly R, Citti C, Glew M D, et al. Phase-locked mutants of Mycoplasma agalactiae: defining the molecular switch of high-frequency Vpma antigenic variation [J]. Mol Microbiol, 2008, 67(6):1196-1210.
- [15] Noormohammadi A H, Markham P F, Kanci A, et al. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of mycoplasma synoviae [J]. Mol Microbiol, 2000, 35(4):911-923.
- [16] Iverson-Cabral S L, Astete S G, Cohen C R, et al. mgpB and mgpC sequence diversity in Mycoplasma genitalium is generated by segmental reciprocal recombination with repetitive chromosomal sequences [J]. Mol Microbiol, 2007, 66(1):55-73.
- [17] Ma L, Jensen J S, Myers L, et al. Mycoplasma genitalium: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome [J]. Mol Microbiol, 2007, 66(1):220-236.
- [18] Allen J L, Noormohammadi A H, Browning G F. The v1hA loci of Mycoplasma synoviae are confined to a restricted region of the genome [J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 3):935-940.
- [19] Nouvel L X, Marendra M, Sirand-Pugnet P, et al. Occurrence, plasticity, and evolution of the vpma gene family, a genetic system devoted to high-frequency surface variation in Mycoplasma agalactiae [J]. J Bacteriol, 2009, 191(13):4111-4121.
- [20] Noormohammadi A H. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis [J]. Avian Pathol, 2007, 36(6):439-444.
- [21] Citti C, Kim M F, Wise K S. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect Mycoplasma hyorhinis escape variants from growth-inhibiting host antibodies [J]. Infect Immun, 1997, 65(5):1773-1785.
- [22] Denison A M, Clapper B, Dybvig K. Avoidance of the host immune system through phase variation in Mycoplasma pulmonis [J]. Infect Immun, 2005, 73(4):2033-2039.
- [23] Simmons W L, Bolland J R, Daubenspeck J M, et al. Stochastic mechanism for biofilm formation by Mycoplasma pulmonis [J]. J Bacteriol, 2007, 189(5):1905-1913.
- [24] Simmons W L, Denison A M, Dybvig K. Resistance of Mycoplasma pulmonis to complement lysis is dependent on the number of Vsa tandem repeats: shield hypothesis [J]. Infect Immun, 2004, 72(12):6846-6851.
- [25] Bayliss C D. Determinants of phase variation rate and the fitness implications of differing rates for bacterial pathogens and commensals [J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(3):504-520.



# 鸡蛋中兽药残留形成过程及防控措施分析

李亚男, 白景英, 孙玲玲, 王丹, 杨帆\*  
(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 应用药物治疗产蛋期蛋鸡的感染性疾病时, 常会引发鸡蛋中的兽药残留问题。这些残留的兽药会直接危害消费者的生命健康 (如过敏反应等), 此外, 还会诱导人体内的细菌产生耐药性, 造成人类感染性疾病的治疗困难。本文结合鸡蛋的形成过程, 对鸡蛋中兽药残留的特点、形成过程及防控措施进行了详细分析。

**关键词:** 兽药残留; 鸡蛋; 形成过程; 防控措施

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)06-0007-05

## Formation, Prevention and Control of Veterinary Drug Residues in Eggs

Li Yanan, Bai Jingying, Sun Lingling, Wang Dan, Yang Fan\*  
(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Poultry treated with pharmaceutical products can lead eggs contaminated with drug residues. Such residues could pose a risk to consumer health. There are two primary concerns regarding the levels of antibiotic residues in eggs, direct toxic effects in humans and the potential for low levels of antibiotic exposure to alter human microflora, leading to disease and the possible development of resistant strains, which could result in the failure of antibiotic therapy in clinical situations. The following is an analysis on the feature, formation, prevention and control of veterinary drug residues in eggs.

**Key words:** Veterinary drug residues; eggs; formation; prevention and control

鸡蛋是人类经常食用的一种动物源食品<sup>[1]</sup>。其所含蛋白质的氨基酸比例符合人体生理需要, 易为机体吸收; 此外鸡蛋中富含胆固醇, 营养价值高<sup>[2]</sup>。但蛋鸡饲养周期长、饲养密度大, 且随着畜牧业养殖集约化程度的提高, 蛋鸡在整个饲养过程中几乎从不运动, 这些因素都导致蛋鸡养殖过程中疾病多发<sup>[3]</sup>。在疾病预防和治疗过程中, 抗微生物药及抗寄生虫药应用广泛, 有时抗微生物药还以促生长的目的被违规使用, 这些都极易造成鸡蛋中的药物残留<sup>[4]</sup>。这些残留的兽药会直接损害消费者的健康——引起毒性反应或过敏反应等, 还会诱导人体内的细菌产生耐药性, 造成人类

感染性疾病的治疗困难<sup>[5]</sup>。

鸡蛋中的兽药残留相较于其他动物性食品而言容易引发更大的问题。这主要是因为各国批准用于产蛋期蛋鸡的兽药品种本来就很少, 此外鸡蛋在体内形成过程往往需要数天时间, 鸡蛋内的某些成分甚至在鸡蛋排出前在鸡体内存留数月之久, 因此将鸡蛋中残留的兽药完全消除常常需要数周时间<sup>[6]</sup>。本文结合鸡蛋的形成过程, 对鸡蛋中兽药残留的特点、形成过程及防控措施进行了详细分析, 以寻找避免鸡蛋中兽药残留的策略。

### 1 鸡蛋中兽药残留特点

#### 1.1 不同药物在鸡蛋中的残留量存在差异

收稿日期: 2014-10-20

\*: 通讯作者

基金项目: 河南科技大学 SRTP 项目(2014267)

不同药物的弃蛋期也不一样,且存在较大差异。同样在内服 25~50 mg 剂量下,土霉素片和四环素片在蛋鸡体内的弃蛋期分别为 2d 和 4d<sup>[7]</sup>。这一差别主要源于药物结构间的差异,四环素和土霉素具有共同的多环并四苯羧基酰胺母核,其结构上的差异仅存在于母核 5 位上:四环素的 5 位基团为氢原子,而土霉素为羟基。这一结构的改变增强了土霉素的极性,使其在动物体内吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 过程发生改变,同时影响了药物在鸡蛋中的残留时间。当然,影响兽药在鸡蛋中残留量的因素是多方面的,包括药物的理化性质(如溶解度、pKa 值、正辛醇和水中的浓度比值的对数值——logP 值等)、蛋鸡的饲养管理、日粮组成、饲养环境等。

### 1.2 同种药物在蛋黄和蛋白中的残留也存在差异

鸡蛋由蛋黄、蛋白、壳膜和蛋壳组成,其中蛋黄和蛋白为主要的可食性部分,这两部分在化学组成上存在差异<sup>[8]</sup>。其中蛋黄中以脂类物质为主,主要为非极性成分,而蛋白中以卵清白蛋白为主,主要为极性成分。这一差异导致了蛋黄和蛋

白中常见药物的残留量存在较大差异,表 1 中比较了几种不同药物在蛋白和蛋黄中的残留情况<sup>[8]</sup>。表 1 中所列的聚醚类离子载体抗寄生虫药在化学结构上均含有许多醚基和一个一元有机酸基团,在溶液中由碳链连接形成特殊构型:中心醚基中的氧原子并列排布而带负电,外周则主要由具强疏水性的烃基组成。因此,从整体上讲,这些聚醚类离子载体抗生素极性低,脂溶性好。但在这 3 种抗寄生虫药中,莫能菌素的极性稍强,因此其在蛋黄中的残留浓度要远低于盐霉素和甲基盐霉素。其在蛋黄和蛋白中残留浓度比仅为 0.7,而另外两种药物的比值分别为 4.0 和 30.0。表 1 中的氟甲喹,因其结构中同时含有羧基和氟原子,极性较强,因此主要残留在蛋白中。磺胺喹噁啉的基本结构式为对氨基苯磺酰胺,其中磺酰胺基团胺基上的氢原子被喹噁啉基团取代后,极性增强,在蛋白中残留的浓度增加。呋喃妥因、呋喃他酮和呋喃西林 3 种硝基呋喃类药物均为极性物质,且其极性依次增强,因此其在蛋白中的残留浓度依次增大。

表 1 蛋鸡混饲(或混饮)给药后几种不同药物在蛋黄和蛋白中的残留情况

药物品种	连续饲喂时间(d)	饲料(或饮水)中药物添加浓度(mg/kg)	药物浓度水平( $\mu$ g/kg)		蛋黄和蛋白中药物浓度比
			蛋黄	蛋白	
莫能菌素	7 <sup>a1)</sup>	110	100	150	0.7
甲基盐霉素	7 <sup>a</sup>	70	1000	250	4.0
盐霉素	7 <sup>a</sup>	60	1500	50	30.0
氟甲喹	10 <sup>b2)</sup>	90	400	2000	0.2
磺胺喹噁啉	7 <sup>a</sup>	100	1300	3700	0.35
呋喃妥因	7 <sup>a</sup>	100	< <sup>3)</sup>	100	NA <sup>4)</sup>
呋喃他酮	7 <sup>a</sup>	100	2000	900	2.20
呋喃西林	7 <sup>a</sup>	100	5000	3000	1.70

1):“a”表示混饲给药;2):“b”表示饮水给药;3):“<”代表药物浓度低于检测方法的定量限;4):“NA”代表 Not applicable(不适用)。

## 2 鸡蛋中兽药残留形成过程

要了解鸡蛋中兽药残留的形成过程,必须首先熟悉鸡蛋的形成和排出过程。相较于肌肉等动物可食性食品而言,鸡蛋的形成过程稍显复杂。鸡蛋的蛋黄、蛋白、壳膜和蛋壳中,只有蛋黄是自卵巢随排卵过程进入到输卵管中的,其他成分均在输卵管内

形成。蛋黄和蛋白中的主要成分构成见表 2。

蛋黄中除水以外,脂类物质占较高比重。这些脂类物质的前体产生自鸡的肝脏,之后通过血液循环被运送到卵巢的卵泡中。产蛋期内,蛋鸡卵巢内通常有多个卵泡均处在不同的发育期,这样能够保证产蛋的连续性。卵泡内的卵黄以指数速度增长,

表 2 鸡蛋的化学成分构成

指标内容	蛋黄	蛋白
pH	6.0-6.8	7.6-9.4
水(%)	49	88
蛋白质(%)	16.5 (包括卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白、 卵黄球蛋白、脂蛋白和抗生物素蛋白)	10.5 (包括卵清蛋白、卵转铁蛋白、类卵粘蛋白和卵粘蛋白)
脂类(%)	33 (甘油三酯类(66%)、磷脂类(28%)和胆固醇(5%))	0.03
糖(%)	0.2	0.5
酶类	淀粉酶、酯酶、磷酸酶、过氧化氢酶和肽酶	溶菌酶
其他	胡萝卜烃色素、黄叶素	

一般需 10 多天才能够成型,在这段时间内如果蛋鸡接触了兽药,药物也会迅速沉积到卵黄中。

卵黄成熟以后,会进入到输卵管中,在此进一步形成蛋白等。蛋白由内向外分为四层:卵带膜层、内稀薄层、中间浓稠层和外稀薄层。蛋白质和水分是蛋白中的主要成分(表 2)。这些蛋白质主要由输卵管膨大部的腺体分泌而来,而水分则主要来自于输卵管的子宫腺。由于水分透入蛋白,便形成了内外稀薄层。与蛋黄相比,蛋白的形成过程更迅速,一般只需要 2~3 h。这一过程虽然较短,但也会为兽药残留提供机会。

蛋白形成后,鸡蛋会到达输卵管峡部,并在此引起该处腺体分泌黏性纤维,于是形成了包围蛋白的内、外壳膜。此膜为角蛋白成分的半透膜。待鸡蛋进入到子宫后会在子宫内停留较长时间,此时由子宫腺体分泌的水和晶体物质可透过内外两层壳膜,稀释蛋白、增加蛋白的容量。

鸡蛋通过峡部后,在已形成的外壳膜基础上开始钙化。之后,鸡蛋进入到子宫中,此处大量碳酸钙及一些磷酸盐和柠檬酸盐会在外壳膜上进一步沉积,形成另一层真壳。随着真壳的产生,又在真壳表面覆盖上一层蛋白质透明膜,即形成了完整的蛋壳。蛋壳的形成与钙的转化密切相关。利用放射性钙示踪物进行的研究显示,蛋壳内 60%~75%的钙来自于进食的钙,其余则来自于体内贮藏。但钙并非贮藏于蛋鸡的子宫内,在低钙日粮情况下,蛋鸡能够调动骨内 25%的钙以供形成蛋壳;在高钙日粮情况下,蛋鸡体内为正钙平衡,会将多余的钙贮藏于骨内。蛋壳虽然不能食用,但其内也可能会有兽

药残留。蛋壳内钙含量丰富,而四环素类药物易与钙离子形成难溶的螯合物。有研究证实四环素类药物会在骨骼、牙齿及蛋壳中沉积<sup>[9]</sup>。另外,有些药物还会影响蛋壳中钙的沉积,有报道<sup>[10-12]</sup>显示磺胺类药物会使蛋鸡产薄壳蛋或软壳蛋的概率增加,而四环素则会使鸡蛋颜色变浅<sup>[13,14]</sup>。

鸡蛋最终形成后,通过阴道产出。产蛋呈现规律性周期,每个产蛋周期都有产蛋序数和间歇期。如连产 3 枚蛋停产 1 d 的,称 3 蛋周期<sup>[15]</sup>。鸡蛋形成的各个过程中,都可能会产生兽药残留,但因蛋黄形成时间最长,因此其内兽药残留出现的概率更大。当然兽药残留量还受其他很多因素影响。

### 3 防控措施

#### 3.1 严禁使用违禁药物

我国农业部对蛋鸡产蛋期允许使用的抗微生物药及抗寄生虫药进行了详细规定<sup>[16]</sup>,具体情况见表 3。从表中可见我国允许蛋鸡产蛋期使用的抗微生物药一共有 7 大类 12 个品种,而允许使用的抗寄生虫药则共有 5 种,其中氨丙啉不需要制定最高残留限量(MRL),但仅作口服给药使用,而潮霉素 B 在蛋鸡产蛋期虽可使用,但蛋中不得检出。因此,在蛋鸡产蛋期应严格按照我国农业部的规定使用这些药物,严禁使用违禁药物。

#### 3.2 严禁超期超量用药

使用化疗药物防治蛋鸡感染性疾病的过程中,化疗药物、机体和病原体(如细菌、病毒或寄生虫)三者之间存在着复杂的相互作用关系——化疗三角。因此,在感染性疾病治疗过程中,应首先选择敏感性药物,并给予充足的剂量或疗程,但同

表 3 我国规定蛋鸡产蛋期允许使用的抗微生物药和抗寄生虫药及其在鸡蛋中的 MRL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

药物	药物种类	MRL
杆菌肽	多肽类抗生素	500
黏菌素	多肽类抗生素	300
红霉素	大环内脂类抗生素	150
泰乐菌素	大环内脂类抗生素	200
林可霉素	林可胺类抗生素	50
新霉素	氨基糖苷类抗生素	500
大观霉素	氨基糖苷类抗生素	2000
噁喹酸	氟喹诺酮类抗微生物药	50
土霉素 / 金霉素 / 四环素	四环素类抗微生物药	200
泰妙菌素	截短侧耳素类抗生素	1000
氨丙啉	抗寄生虫药	不需要制定 MRL, 仅作口服用
溴氰菊酯	抗寄生虫药	30
氟苯咪唑	抗寄生虫药	400
吡嗪	抗寄生虫药	2000
潮霉素 B	抗寄生虫药	允许使用, 但蛋中不得检出

时严禁超量超期使用;更不能将治疗用的抗生素添加到饲料中长期饲喂来预防疾病。因为这样不但会增加鸡蛋中兽药残留的风险,而且还会导致病原体产生耐药性,增大感染性疾病的治疗难度。

### 3.3 完善并严格执行兽药弃蛋期规定

目前,欧洲药品管理局、美国食品药品监督管理局、日本厚生劳动省等机构针对当地居民的饮食习惯,结合当地蛋鸡用药情况,对各种兽药的弃蛋期都进行详尽的规定。我国农业部也制定了一些兽药的弃蛋期,这对控制鸡蛋中的兽药残留起到了一定的积极作用。但针对某些制剂产品,还缺少详尽的弃蛋期规定。因此应根据我国的制剂水平和用药方式,尽快制定适合我国国情的弃蛋期标准。此外,在使用已有弃蛋期的药物时,要严格执行弃蛋期的规定,以防鸡蛋中出现兽药残留。

### 3.4 加大兽药残留监管力度

加强我国兽药残留监控体系建设,扩大兽药残留监控网络,提高我国兽药残留监测水平和快速反应能力,加大鸡蛋中兽药残留的抽检力度,积极开展鸡蛋中兽药残留检测方法研究,力图实现快速、准确地定量鸡蛋中兽药残留的目的;同时,向兽药和饲料生产企业及畜禽饲养者大力宣传国家的相关政策及兽药残留的危害。

### 3.5 加强对兽药厂和饲料厂的管理

各级药政部门要加大查处力度,坚决制止兽药厂违法生产销售“复方兽药”制剂,坚决制止饲料厂在饲料中添加违禁药物;进一步加强对兽药及药物添加剂标签、说明书的管理,标签必须按照《兽药管理条例》规定,标明药物的化学名称、含量、休药期;严格执行兽医处方药制度。

### 参考文献:

- [1] 杨坚,黄俊文. 蛋氨酸锌螯合物的生化性质及其在养鸡业中的应用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2000, 22(2):3-6.
- [2] 张海富. 浅谈笨鸡围栏生态放养[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(3):24-26.
- [3] 赵一夫,薛莉,秦富. 我国蛋鸡产业生产状况及发展形势分析[J]. 中国家禽, 2010, 32(4):1-7.
- [4] 刘明生,甘辉群. 鸡蛋中药物残留形成的原因与监控研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(6):32-34.
- [5] Yang F, Liu H W, Li M, et al. Use of a Monte Carlo analysis within a physiologically based pharmacokinetic model to predict doxycycline residue withdrawal time in edible tissues in swine[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2012, 29(1):73-84.
- [6] Goetting V, Lee K A, Tell L A. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2011, 34(6):521-556.
- [7] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 第三版. 北京:中国农业出版社,

- 2013:248-251.
- [8] Aerts M M, Hogenboom A C, Brinkman U A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995, 667(1):1-40.
- [9] Harcourt J, Nw J, E S. Incorporation of tetracycline antibiotics in bone, teeth, and egg shells [J]. *J Dent Res*, 1962, 41(3):511-515.
- [10] Bernard R, Genest P. Sulfonamides and egg-shell formation in the domestic fowl [J]. *Science*, 1945, 101(2633):617-618.
- [11] Mehring A, Titus H, Brumbaugh J. Effects of two sulfonamides on the formation of egg shells [J]. *Poultry Sci*, 1955, 34(6):1385-1389.
- [12] Furusawa N, Kishida K. Transfer and distribution profiles of dietary sulphonamides in the tissues of the laying hen [J]. *Food Addit Contam*, 2002, 19(4):368-372.
- [13] Bray D J, Ridlen S F. Discoloration of egg shells from feeding high levels of certain tetracyclines [J]. *Poult Sci*, 1967, 46(1):258-259.
- [14] HJ E, Re D, Tm F, et al. Dietary factors affecting tetracycline absorption and egg shell coloration in caged layers [J]. *Poultry Sci*, 1960, 39(5):1248.
- [15] 陈杰. 家畜生理学 [M]. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 464.
- [16] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》[Z]. 2002.

## 2014“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,本刊决定评选 2014 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织专家组进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2015 年第 1 期公布。

广东永顺生物制药股份有限公司高度重视并鼎力支持本刊优秀论文评选活动,决定自 2014 年度起将总奖金增至 30000 元,同时在奖项安排上增设特等奖 1 篇,一等奖的奖金由 2000 元/篇增至 3000 元/篇。

1、**评选范围:**本刊 2014 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文 17 篇,分设特等奖 1 篇、一等奖 2 篇、二等奖 4 篇、三等奖 10 篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:**总奖金 30000 元,由广东永顺生物制药股份有限公司赞助。其中特等奖奖金 8000 元/篇;一等奖奖金 3000 元/篇;二等奖奖金 1500 元/篇;三等奖奖金 1000 元/篇。

### 欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2014 年 2 月 18 日

# 猪胎衣的主要成分及其应用进展

王 琪, 吴传文, 曾勇庆\*

(山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

**摘 要:** 猪胎衣中含有丰富的细胞因子、激素、氨基酸、酶、维生素、微量元素等物质, 具有极高的营养、保健价值, 但生产中不能对其合理利用, 多在母猪产仔以后遗弃, 造成资源浪费的同时引起环境污染。如何合理利用养猪生产产生的大量胎衣成为一项重要课题, 为此, 本文在分析胎衣主要成分及其功能的基础上探讨胎衣的应用价值及其应用进展。

**关键词:** 猪; 胎衣; 保健; 免疫性能

**中图分类号:** S828

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0012-03

猪胎衣是猪胎盘和胎膜的统称, 母猪生产时随仔猪一起被排出体外。胎衣是仔猪幼体在母腹中的营养供给所在, 含有丰富的蛋白质, 营养价值很高, 是母猪很理想的补充营养和催乳的食物之一。近年来对动物胎衣的研究不断加深, 对其营养作用及药用价值多有报道, 临床应用也更加广泛。

## 1 胎衣的营养成分

有科研机构对胎衣进行分析测定, 表明猪胎衣的干物质中含有消化能 3.4 Mcal/kg, 可消化粗蛋白质 612 g/kg, 粗蛋白含量占 74.3%, 钙、磷含量分别占 0.73%、1.18%<sup>[1]</sup>。胎衣的蛋白组分为: 甘氨酸 5.15%、亮氨酸 4.47%、赖氨酸 3.84%、精氨酸 3.64%、缬氨酸 2.68%、苯丙氨酸 2.33%、组氨酸 1.09%、蛋氨酸 0.60%、胱氨酸 0.45%, 猪胎衣几乎富含所有的猪所必需的氨基酸, 是具有很高生物学价值的蛋白资源<sup>[2]</sup>。

现代医学研究发现哺乳动物胎盘中含有丰富的激素(如促性腺激素、类固醇激素、肽类激素等)、微量元素(Ca、P等)、细胞因子以及维生素A、E等物质。在母畜结束妊娠之后, 如不能合理处理胎衣, 胎盘中所含有的营养物质等都会流失。但有研究表明, 胎儿出生后, 胎盘可以开发利用成为医药、美容以及食品的原材料<sup>[3,4]</sup>。

## 1.1 激素

哺乳动物胎盘含有各种激素, 包括促绒毛膜性腺激素、催乳素、雌激素、雄激素、雌二醇、孕酮等。猪胎盘的促绒毛膜性腺激素、孕激素、雌激素、催乳素及孕酮等的含量与人有一定的差异<sup>[5-7]</sup>。有人用放射性免疫法测定人、猪、牛胎盘及不同温度处理的加工品中孕酮、促绒毛膜性腺激素、催乳素的含量, 结果表明人与不同动物这3种激素含量存在很大差异, 不同温度对它们的含量也有一定影响。据此, 他们推测猪胎盘中很有可能是这3种激素的类似物<sup>[8]</sup>。

雌激素和孕激素均属于类固醇激素, 由肾上腺分泌, 与此同时分泌的还有雄激素、糖皮质激素和盐皮质激素。孕激素与雌激素协同作用使子宫内膜增厚, 促进受精卵在子宫内膜的着床及着床后的生存。正常情况下, 只有很少量的类固醇进入胎儿血液循环, 大多数类固醇在通过胎盘的类固醇激素屏障时被转为活性较低或无活性的代谢产物, 使胎儿避免母体高浓度类固醇的影响, 能够正常发育。

## 1.2 酶及酶抑制剂

胎盘中含有纤溶酶原激活因子、库尼特型蛋白酶抑制剂以及与胎盘形成和营养物质调控起重要作用的酶及酶抑制剂, 对于医学研究有重要意义。

### 1.3 细胞因子

细胞因子是由免疫细胞产生的一类免疫功能的生物活性物质,具有广泛的生理和病理作用<sup>[9]</sup>。细胞因子包括白细胞介素(interleukins, ILs)、干扰素(IFN- $\beta$ )、肿瘤坏死因子-A(tumor necrosis factor, TNF-A)、集落刺激因子-1(CSF-1)、人胎盘免疫调节因子(HPIF,又名胎盘肽PIP)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、白血病抑制因子(LIF)、胰岛素样生长因子(IGFs)等<sup>[10]</sup>。

胎盘中含有大量的ILs、IFN- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 等生物活性因子及生长因子,二者以某种特定的方式共同调节胚泡着床、胎儿生长及妊娠分娩等生理活动。此外,由胎盘产生的生长因子还直接调控胎儿营养物质代谢、细胞分化及细胞凋亡等生理过程。有研究发现,胎盘提取物中含有免疫促进因子和免疫抑制因子,二者对胎儿和母体的互作过程进行局部免疫调节,有利于胎儿的成活<sup>[11]</sup>。

### 1.4 氨基酸

胎衣中含有丰富的畜禽必需氨基酸及非必需氨基酸,其中Lys、Leu的含量远高于乳制品中相应氨基酸含量。猪胎衣氨基酸含量丰富,是具有极高利用价值的蛋白资源。

### 1.5 微量元素

猪胎盘含有丰富的微量元素,其中钙、磷含量较高,是作为畜禽微生态制剂、人类保健品及饲料研究的较好原材料。

## 2 猪胎衣的临床应用

### 2.1 养殖生产对胎衣的使用现状

胎衣是仔猪幼体在母体中的营养供给所在,血管丰富,营养价值高,是母猪理想的补充营养和催乳的食物之一。但目前国内很多养殖户没有认识到胎衣的营养价值,而是将其丢弃,实属可惜。母猪产仔后,体能大量消耗,采食量减退,有些初产母猪或老母猪产后无奶或乳汁分泌少,不能满足仔猪的需求,特别是冬季青饲料匮乏,母猪乏乳现象更容易发生。一般饲料的营养价值不高,恢复母猪体能较慢,要想尽快恢复母猪元气,提高其泌乳能力和仔猪的成活率,关键是促进母猪的食欲,补充足够的营养物质。一些猪场或养殖户为提高母猪的泌乳能力,尝试给母猪食用胎衣。在实际应用上,已有将猪胎盘加入饲料喂母猪用来催乳的

报道<sup>[12-14]</sup>。

### 2.2 胎衣的临床应用试验研究

郭肇阳<sup>[1]</sup>通过多年试验研究证明,把猪胎衣脱水制成干粉,按一定比例配成配合饲料,无论饲养任何动物,都具有明显的促进畜禽生长、提高生产性能的效果;其研究还表明:凡是让饲喂胎衣的产仔母猪,其所产哺乳仔猪相比于一般仔猪白痢、贫血、感冒等仔猪易发疾病的发病率大大降低,仔猪成活率达到95%以上,其中不少育成率达100%;另外在家禽方面的试验,作者分别用2%的猪胎衣粉混合的饲料饲喂来航鸡和罗斯鸡,发现它们比普通饲料喂养的鸡成长快、成熟早、产蛋量高。可见猪胎衣作为饲料添加剂具有良好的经济效益。

另外,有人认为胎衣可以治疗母猪不孕症、缺乳症、公猪阳痿等疾病,但目前尚未有相关研究<sup>[15]</sup>。因此,对于胎衣作为饲料添加剂治疗母猪繁殖障碍疾病及机体免疫力低下症仍需进一步研究。

## 3 胎衣的应用前景

### 3.1 增强动物免疫力

胎盘中含有丰富的脂多糖、胎盘肽等物质,具有增强免疫力,提高动物抗应激能力的作用。

苏是焯等<sup>[16]</sup>研究发现,胎盘能提高小鼠T淋巴细胞比例,增强小鼠免疫力。2006年周国华等<sup>[17]</sup>通过对幼兔实验得到了一致的结论,胎盘肽对增强幼兔淋巴细胞表面受体活性、提高细胞免疫功能效果显著。另有大量实验表明母猪胎盘制剂对于提高动物集体淋巴细胞转化、巨噬细胞吞噬指数等免疫机能作用明显<sup>[18,19]</sup>。

### 3.2 用于人类保健,延缓衰老

胎盘含有的多种氨基酸、维生素、酶、微量元素等,可用于人类保健,对增强人体抵抗力、记忆力、抗应激、增强免疫力、调节内分泌、延缓衰老、保养皮肤等功效显著。

刘少娟等研究表明,羊胎素能延长果蝇寿命,减少脂质过氧化,具有一定程度的抗衰老作用<sup>[20]</sup>。王亮通过培养新生小鼠表皮基底细胞实验,证实胎盘具有营养和生长因子功能,能够促进细胞增殖和新陈代谢,用作化妆品可以达到除疤去皱,改善皮肤的功效<sup>[21]</sup>。董泉洲等证明胎盘营养液能降低小鼠脑组织脂褐质含量,具有延缓衰老作用,研究发现

用羊胎盘液制备的化妆品能促进老化细胞的分解和排出,改善皮肤的中间代谢,促进皮肤营养供给及废物排泄,达到保养皮肤的作用<sup>[22]</sup>。胎盘还可提高机体肝功能,可以治疗肝炎;可以提高小鼠放疗和化疗时的免疫功能,间接杀死肿瘤细胞<sup>[23]</sup>;猪、牛胎盘还可治疗小鼠的失血性贫血,预防环磷酰胺等化学物造成的损伤性贫血<sup>[24]</sup>。从猪胎盘分离的脂多糖也具有明显的免疫促进作用,已被制成安全、有效的注射剂,广泛用于治疗支气管哮喘、慢性气管炎和感冒预防药。

### 3.3 猪胎盘的市场需求

目前胎盘产品的制备主要以人胎盘为原料,然而人胎盘来源短缺,不能满足医药、食品等多方面的需求,养殖生产中猪、羊、牛等动物胎盘往往在生产中被遗弃的同时造成环境污染,因此充分利用丰富的动物胎盘,研究动物胎盘在形态、成分、功能等方面的特征,开发动物胎盘的利用价值,为胎盘类产品的发展提供坚实的物质基础。

我国养猪业发展规模宏大,猪胎盘来源广、数量多,充分探索其生物活性,借助先进的科学技术将哺乳动物胎盘开发成更高利用价值的产品,如将之开发为保健品、医药、化妆品、饲料添加剂等,必将带来巨大的经济效益。

## 4 小结

胎衣活性物质的研究方兴未艾,一些研究取得了比较理想的成果,但仍有一些研究存在不足。胎盘中的有效成分还不是十分清楚,各成分的相互作用机制及控制疾病的作用机制还有待于进一步研究探索,将有疾病的母猪胎衣饲喂动物或制成保健品应用于人类会不会传染疾病,动物胎盘还存在着质量控制、疾病监测、成分稳定性等多种问题。为此,我们还需要对胎盘及其产品的药理作用机制进行深入的研究,加大对胎盘生物活性物质的研究,明确其组成成分,改进其分离、加工工艺,制定动物胎盘相关产品生产和开发的卫生、质量标准,促进这一新兴产业的健康发展。

### 参考文献:

[1] 郭肇阳. 猪胎衣—值得开发的蛋白资源[J]. 农牧产品开发, 1998(4): 18.  
[2] 吴凌, 李金香, 王国良, 等. 人和动物胎盘药理作用和临床应用的研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, 13(2):

68-71.  
[3] 胡成波, 王洗清. 猪胎衣喂猪营养又治病[J]. 中兽医医药杂志, 2011(4): 61.  
[4] 房新平, 夏文水, 生庆海, 等. 论胎盘的功能及其开发利用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(9): 189-191.  
[5] 张丽君, 乔传卓, 余慕婉. 紫河车和几种动物胎盘及其加工品的放射免疫分析评价[J]. 中药材, 1995, 18(12): 622-623.  
[6] 张天钧. 胎盘荷尔蒙[J]. 当代医学(台湾), 1997, 24(9): 708-710.  
[7] 吴凌, 李金香, 王国良. 人和动物胎盘药理作用和临床应用研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, 13(2): 68-71.  
[8] 张丽君. 紫河车和几种动物胎盘及其加工品的放射免疫分析评价[J]. 中药材, 1995, 18(12): 622-623.  
[9] 黄洁, 王钊, 李小波. 胎盘生物活性物质和质量控制研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(11): 833-836.  
[10] 姜泽. 补金片、补金胶囊质量标准研究[D]. 吉林农业大学, 2011.  
[11] Georgieva R, Stefanov D, Fichorova R, et al. Effects of the whole extract and the chromatographic fractions of the pig placenta on lymphocyte proliferation and humoral immune response [J]. Theriogenology, 1995, 44(4): 539-551.  
[12] 刘泽隆, 张勇. 家畜胎盘生物活性物质的研究进展[J]. 西北农业大学学报, 1999, 21(4): 82-87.  
[13] 徐静娟, 朱明, 邓立. 羊胎盘保健食品的功效研究[J]. 食品工业科技, 2002(增): 89-93.  
[14] 房新平, 夏文水, 生庆海, 等. 论胎盘的功能及其开发应用[J]. 食品研究与开发, 2006(9): 5-6.  
[15] 胡成波. 莫把猪胎盘当成废物处理[J]. 科学种养, 2009(4): 40-41.  
[16] 苏是煌, 林志和, 陈北阳. 紫河车对小鼠细胞免疫功能的调节作用[J]. 湖南中医药杂志, 1993, 9(6): 44-46.  
[17] 周国华, 孟凡军, 王永志, 等. 羊和猪胎盘肽的制备及其生物活性的初步研究[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(3): 19-22.  
[18] 崔玉丹, 蔡英姬, 金河奎. 胎盘粉制剂的免疫学实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(3): 29-31.  
[19] 吴梧桐, 高向东. 猪胎盘多糖的分离纯化及其对脾淋巴细胞的诱导作用[J]. 生物化学杂志, 1990, 6(2): 111.  
[20] 刘少娟, 陈冠敏. 羊胎素延缓衰老的实验研究[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(3): 196-197.  
[21] 王亮. 新生小鼠表皮细胞的培养[J]. 日用化学工业, 2001(1): 61-62.  
[22] 董泉洲, 尚尔和, 王小惠. 羊胎盘营养液的制备及其在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 1998(1): 12-13.  
[23] 李延兰, 丰慧根, 任太芳, 等. 胎盘免疫调节肽对放疗小鼠免疫功能的影响[J]. 新乡医学院学报, 1997, 14(3): 272-274.  
[24] 张淑二, 陶勇, 张运海, 等. 胎盘的有效成分及其应用[J]. 动物医学进展, 2007(9): 19-20.



# 黄芪多糖在肉鸡养殖业上的应用

刘瑞生

(甘肃省畜牧兽医研究所, 甘肃 平凉 744000)

中图分类号: S853.75

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)06-0015-04

黄芪是一种常用的补益中药,其主要活性成分黄芪多糖(APS)具有促进抗体生成,诱导干扰素产生和促进免疫反应等多方面的作用,在肉鸡养殖业上的研究应用报道较多。现概述如下:

## 1 黄芪多糖的化学性质

黄乔书等<sup>[1]</sup>从黄芪分离得到两种葡聚糖和两种杂多糖。陈洪亮等<sup>[2]</sup>测定发现黄芪粗多糖由2种组分组成,组分I(APS1)分子量为67 600,主要由葡萄糖组成,还有甘露糖、半乳糖、果糖、木糖和岩藻糖,摩尔比为22.776:3.518:1:3.704:2.981:0.745;红外图谱显典型的多糖图谱,兼有 $\alpha$ 和 $\beta$ -糖苷键;理化性质显示为中性多糖,旋光度为+45.01;紫外图谱显示不含蛋白质及核酸,但蛋白质和氨基酸测定显示:黄芪粗多糖是含一定蛋白质的糖蛋白。高艳艳<sup>[3]</sup>通过毒性试验和安全性评价,发现黄芪多糖属无毒,并具有无热原、刺激性低的特点。提示黄芪多糖可用于口服、注射、滴鼻、点眼多种应用方式,且无毒副作用、安全可靠。

## 2 黄芪多糖的生物学作用

### 2.1 免疫增强作用

大量研究表明,黄芪多糖具有免疫增强作用。刘永杰等(1999)和高文学等(2000)对1日龄AA肉用雏鸡分别肌肉注射黄芪多糖35 mg/kg·d和香菇多糖8mg/kg·d,连续7d,IL-2诱生活性和淋巴细胞增殖反应均高于或显著高于对照组雏鸡,巨噬细胞活性显著提高,黄芪多糖生物学效应优于香菇多糖<sup>[4,5]</sup>。李繁等<sup>[6]</sup>分别于7和14日龄时以1 000、5 000个E. Tenella球虫卵囊/只免疫艾维茵雏鸡2次,并于首免时注射卡介苗(BCG)或黄芪多糖(APS)1次,21日龄以5万和25万卵囊

攻击,测定结果表明BCG和APS能显著提高球虫免疫鸡淋巴细胞转化水平和E-玫瑰花环形成率,是鸡体单核-巨噬细胞系统的有效激活剂。陈洪亮等<sup>[2]</sup>试验发现40、80和160 ng/L黄芪多糖均可显著提高肉鸡脾淋巴细胞转化率,40、80 ng/L黄芪多糖显著促进脾淋巴细胞IL-2的分泌,黄芪多糖显著抑制了正常及地塞米松处理巨噬细胞IL-1的分泌。章世元等<sup>[7]</sup>将4种不同浓度的苜蓿多糖和黄芪多糖分别加入到肉鸡血液淋巴细胞和脾脏淋巴细胞中培养48h,在一定浓度下能显著促进肉仔鸡血液和脾脏中淋巴细胞的增殖,其中苜蓿多糖以20  $\mu$ g/mL,黄芪多糖以100  $\mu$ g/mL效果最好,黄芪多糖对肉仔鸡淋巴细胞增殖的效果要好于苜蓿多糖。胡文举等<sup>[8]</sup>在7日龄AA肉鸡基础日粮中添加0.2%黄芪多糖,能极显著提高AA肉鸡的免疫器官指数和免疫球蛋白浓度。

### 2.2 抗细菌作用

黄芪多糖具有抗菌作用。一方面对细菌及其毒性产物发挥直接抑杀和解毒作用;另一方面通过调动机体免疫防御功能而发挥扶正祛邪,抑菌、杀菌作用。李万坤等<sup>[9]</sup>试验证明,香菇多糖、银耳多糖和黄芪多糖能促进感染禽败血性支原体病鸡肠道双歧菌和乳酸菌的生长,从而减少有害菌的数量。李树鹏等<sup>[10]</sup>研究结果表明:10、20和40 mg/L的黄芪多糖体外对2株益生菌(乳酸菌和芽孢杆菌)均有显著抑制作用,对3株致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌)除10 mg/L浓度对大肠杆菌作用不显著外,其余均显著抑制致病菌生长,且以20 mg/L效果最佳;试验结果显示黄芪多糖在体外能抑制致病菌的生长,且黄芪多糖对2株益生菌也存在抑制作用。胡文举等<sup>[11]</sup>测定黄

连素和黄芪多糖对 4 株鸡源大肠杆菌的最低抑菌浓度,结果表明:通过联合用药,使黄连素的抗菌活性提高了 2~8 倍,黄芪多糖的抗菌活性提高了 1~2 倍;黄连素和黄芪多糖联合使用,能够减少药物的使用量,可用于防治鸡大肠杆菌病。

### 2.3 抗病毒作用

黄芪多糖是一种干扰素诱导剂,能够使动物机体产生内源性干扰素,从而达到抗病毒的目的。时秀梅等<sup>[12]</sup>研究发现,黄芪多糖对传染性喉气管炎病毒和马立克氏病病毒有较强的抑制作用。任宇皓等<sup>[13]</sup>将黄芪多糖和淫羊藿多糖在先于新城疫病毒(NDV) I、IV 系加入到培养 24 h 的鸡胚成纤维细胞中时,于病毒接种后 72 h 测定结果表明对 NDV 有抑制作用,提示它们有一定的抗病毒作用,且与浓度有相关性。陈洪亮等<sup>[2]</sup>检测表明黄芪多糖对 NDV 有显著的抑制作用,使其血凝滴度降低,但只在 500  $\mu$ g/L 时达到显著水平;黄芪多糖对鸡胚内 NDV 有一定抑制作用;黄芪多糖能通过提高肉鸡 HI 抗体水平,降低 NDV 强毒攻击鸡的死亡率。侯卫东等<sup>[14]</sup>试验表明,不同浓度板蓝根和黄芪提取液在中和作用、阻断作用、抑制作用三个方面对 NDV 均有一定的效果,且药液抑制 NDV 感染力的作用强弱与药物的浓度和药物与病毒的作用方式均有关系。

### 2.4 抗肿瘤作用

黄芪多糖对多种实验型肿瘤有明显的抑制作用,在抗肿瘤治疗时应用比较广泛,常为辅助用药。魏萍等<sup>[15]</sup>对感染禽成髓细胞性白血病病毒雏鸡分别给予黄芪多糖(APS)和香菇多糖(LNT),提高了脾和胸腺等免疫器官中脂质过氧化物(LPO)含量,清除肿瘤细胞作用明显加强,降低了雏鸡的发病率和死亡率。其中 APS 主要作用用于早期,而 LNT 主要在中后期。

### 2.5 对机体代谢的影响

黄芪多糖对机体代谢有一定影响作用,可以提高机体的抗病力。高学军等<sup>[16]</sup>观察到黄芪多糖对禽成髓细胞性白血病病毒感染的 3 日龄 AA 肉用雏鸡的脾脏和法氏囊淋巴细胞化学发光(CL)有明显增强作用,提示黄芪多糖和香菇多糖抗肿瘤的作用机理可能与其增强淋巴细胞氧自由基代谢有关。郝艳红等<sup>[17]</sup>给感染马立克氏病病毒的 1 日

龄雏鸡注射黄芪多糖和香菇多糖后,均显著增强中枢和外周淋巴器官和主要实质器官含硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GSHPx)的活性,明显降低 LPO 含量,降低马立克氏病的发病率和死亡率。表明两种多糖对雏鸡免疫器官和主要实质器官组织的自由基有保护作用。

## 3 黄芪多糖在肉鸡养殖业上的应用

### 3.1 作为饲料添加剂

研究证实,在饲料中添加黄芪多糖能增强小肠对营养物质的吸收能力,减少应激,提高免疫功能和抗氧化机能,促进肉鸡生长,改善饲料报酬,减少死亡率。王志祥等<sup>[18]</sup>在 1 日龄艾维茵肉仔鸡基础日粮中分别添加 0.2%和 0.3%黄芪提取物饲喂 42 d,能显著提高肉仔鸡体重、日增重和饲料转化效率、血清谷胱甘肽过氧化物酶活性、胸腺指数和法氏囊指数,降低血清胆固醇和丙二醛含量。李亚杰等<sup>[19]</sup>在日粮中添加饲喂益生菌、黄芪多糖、合生元和微胶囊制剂均能显著提高艾维茵肉仔鸡增重,降低料肉比,明显提高免疫器官指数,血清总蛋白和  $\alpha$ -淀粉酶含量显著升高,血糖含量显著降低,以益生菌和黄芪多糖组成的合生元微胶囊制剂效果最好。卢亚萍等<sup>[20]</sup>在 1 日龄艾维茵肉仔鸡基础日粮中添加 320 g/t 黄芪多糖饲喂 6w,能显著提高肉仔鸡增重,降低料重比,提高细胞和体液免疫功能。赵云焕等<sup>[21]</sup>发现益生菌处理和益生菌、黄芪多糖联合处理均能显著提高固始鸡雏鸡周增重,黄芪多糖和益生菌合生元处理的固始鸡雏鸡法氏囊指数和脾脏指数均显著高于对照组,免疫后 7d、14d、28 d,黄芪多糖和益生菌合生元处理的固始鸡雏鸡血清新城疫抗体效价均明显高于对照组。魏炳栋等<sup>[22]</sup>在 1 日龄三黄肉仔鸡基础饲料中添加 0.3%和 0.6%黄芪多糖饲喂 56d,可显著提高三黄肉鸡生长性能,试验组体重显著高于对照组,盲肠中大肠杆菌和沙门氏菌数量分别显著和极显著低于对照组,乳杆菌和双歧杆菌数量显著和极显著高于对照组,可见饲料中添加黄芪多糖可以提高三黄鸡生长性能,优化肠道微生物区系,0.6%黄芪多糖添加量效果最明显。王虹玲等<sup>[23]</sup>研究表明,0.2%复合微生态制剂和 2.5%的黄芪多糖能提高肉鸡的生长性能,改善其肠道微生态环境,增强肉鸡免疫功能。

### 3.2 作为免疫增强剂

黄芪多糖作为免疫增强剂使用,能够提高肉鸡抗病力,与疫苗混合使用能提高免疫效果,增强抗体效价和作用时效。谢明权等<sup>[24]</sup>在球虫免疫过程中配合使用免疫增强剂卡介苗(BCG)和黄芪多糖(APS),能明显增强艾维茵肉鸡抗球虫免疫保护力,更有效地抵抗5万和25万*E. Tenella*球虫卵囊的攻击,但BCG效果优于APS。高艳艳等<sup>[3]</sup>观察发现黄芪多糖对肉仔鸡免疫功能有一定增强作用,可提高肉仔鸡新城疫抗体水平,可与疫苗联用提高疫苗的保护力。王学斌等<sup>[25]</sup>分别用盐酸左旋咪唑、黄芪多糖粉剂、黄芪多糖针剂和黄芪多糖免疫佐剂与鸡新城疫油乳剂疫苗同时使用,均提高了疫苗的免疫力,其中与疫苗混合后作为免疫佐剂使用的黄芪多糖可明显促进固始鸡抗体产生,提高脾和法氏囊指数以及E-玫瑰花环形成率。罗燕等<sup>[26]</sup>对1日龄肉杂鸡注射黄芪多糖分级组分,能显著提高禽流感-新城疫重组二联活疫苗抗体效价,促进淋巴细胞增殖,提高血清中IL-2含量。杨松等<sup>[27]</sup>在肉鸡2和6周龄分别注射0.5 mL/羽禽流感(AI)灭活苗进行首免和二免,同时试验组肉鸡分别每天口服高剂量和低剂量黄芪多糖1 mL/羽,结果试验组肉鸡体重、脾和法氏囊指数均显著提高,二免后AI血凝抑制抗体效价显著升高。陈强等<sup>[28]</sup>在肉鸡21d和42d分别注射0.3 mL/羽NDV LaSota疫苗进行首免和二免,试验组鸡分别注射0.3和0.6 mL/只黄芪多糖注射液,结果试验组肉鸡体重、脾和法氏囊指数均显著高于对照组,得出黄芪多糖可提高肉鸡体重、免疫器官指数及新城疫抗体效价的结论。赵天章等<sup>[29]</sup>在1日龄艾维茵肉仔鸡基础日粮中分别添加0.1%、0.5%、1%和2%的黄芪多糖饲养42d,可提高肉仔鸡平均日增重、平均日采食量,降低料肉比,对肉仔鸡的生长性能有促进作用,其中以1%APS组效果最佳;可提高肉仔鸡新城疫抗体滴度和血清IgG、IgM与IgA浓度,促进外周血T淋巴细胞亚群的增殖,其中以0.5%~1%组的促进效果较好。综合生长和免疫指标,肉鸡日粮中APS的最佳添加剂量为1%。

### 3.3 防治疾病

黄芪多糖能够防治肉鸡疾病,提高成活率。姜

力等<sup>[30]</sup>以鸡传染性喉气管炎强毒对4~5周龄不免疫鸡攻击前后用不同剂量黄芪多糖肌注、饮水,结果防治效果基本相同,给药5 mL/只鸡保护率为70%~80%,给药1~2 mL/只鸡保护率为40%~60%,表明黄芪多糖注射液对鸡传染性喉气管炎具有明显的预防和治疗效果。刘永杰等<sup>[31]</sup>对1日龄AA肉用雏鸡以马立克氏病病毒人工感染后,马立克氏病发病率和死亡率分别为33.75%和11.25%,IL-2诱生活性和T淋巴细胞增殖反应降低和显著降低;感染雏鸡注射香菇多糖和黄芪多糖,马立克氏病发病率分别为20%和17.5%,死亡率分别为7.5%和5%,IL-2诱生活性和T淋巴细胞增殖反应均升高或显著升高。刘利春等<sup>[32]</sup>肌注2 mL/kg复方黄芪多糖注射液治疗人工感染传染性喉气管炎黄羽肉鸡,死亡率(16.7%)显著低于感染对照组(43.5%),有效率(83.3%)显著高于感染对照组(56.7%);痊愈率(76.7%)极显著高于感染对照组(23.3%),增重率(77.5%)与感染对照组(67.5%)无显著差异;复方黄芪多糖注射液对鸡传染性喉气管炎有较好的治疗效果,建议临床以2 mL/kg肌注一个疗程(3d)。姜新发等<sup>[33]</sup>对20日龄人工感染传染性法氏囊病病毒的AA肉鸡分别用黄芪多糖单独治疗和黄芪多糖与干扰素联合治疗,治愈率分别为96.7%和90%,法氏囊重/体重值、脾重/体重值接近空白组。

## 4 影响黄芪多糖作用效果的因素

肉鸡饲养阶段不同,性别不同,黄芪多糖作用效果也不同。王俊丽等<sup>[34]</sup>在1日龄AA肉仔鸡基础日粮中添加黄芪多糖500、1000、2000、3000 mg/kg试验7w,对试验前期肉仔鸡生产性能和免疫功能有显著影响,且对不同性别肉仔鸡生产性能的作用效果不同,母鸡效果明显优于公鸡,以1000和2000 mg/kg组效果最好;黄芪多糖可提高试验前期公母鸡新城疫抗体效价水平,其中1000 mg/kg均达到显著水平。

黄芪多糖使用剂量不同,对肉鸡作用效果不同。金光明等<sup>[35]</sup>在1日龄肉杂雏鸡饮水中分别添加100(I组)、200(II组)、300(III组)和400 mg/L(IV组)黄芪多糖40d,各试验组鸡的日增重较对照组有所提高,试验I和II组采食量和料重比较对照组显著降低,试验III和IV组采食量和料

重比较对照组极显著降低, 试验 II、III 和 IV 组死亡率较对照组极显著降低, 以试验 IV 组效果最好, 说明黄芪多糖可提高雏鸡日增重, 并降低采食量和料重比。

黄芪多糖和其它物质结合使用, 具有协同增强作用。朱正生等<sup>[36]</sup>对 12 日龄三黄羽肉雏鸡分别饲喂添加 200 mg/kg 黄芪多糖 +100 mg/kg  $\gamma$ -氨基丁酸、400 mg/kg 黄芪多糖 +100 mg/kg  $\gamma$ -氨基丁酸、800 mg/kg 黄芪多糖 +100 mg/kg  $\gamma$ -氨基丁酸和 400 mg/kg 黄芪多糖的日粮 42 d, 均能显著提高雏鸡总增重和平均日增重, 降低料肉比; 黄芪多糖组总增重、平均日增重较对照组有所提高, 料重比降低; 复方组和黄芪多糖组均能显著提高雏鸡血清新城疫抗体效价, 复方组效果优于黄芪多糖组。表明  $\gamma$ -氨基丁酸和黄芪多糖共同添加对于改善和提高肉雏鸡的生长和免疫性能有良好的促进作用。

目前黄芪多糖有粉剂和注射剂两种剂型, 通过饲喂和注射两种不同途径给药。王学斌等<sup>[37]</sup>研究发现, 黄芪多糖粉剂和注射液均可提高固始鸡脾指数和法氏囊指数, 均能显著提高 E-玫瑰花环形成率, 黄芪多糖粉剂效果优于黄芪多糖注射液; 黄芪多糖粉剂和黄芪多糖注射液均可显著促进雏鸡生长, 提高鸡生产性能, 尤其在日粮中添加黄芪多糖粉剂后, 鸡只食欲旺盛, 个体大, 精神好。

综上所述, 黄芪多糖在肉鸡养殖业上具有广阔的应用前景, 应该改进黄芪多糖提取、分离、纯化技术, 提高黄芪多糖收取率和含量, 研究不同生长发育阶段最适添加剂量, 继续对黄芪多糖作用机理进行深入研究, 加强其在肉鸡养殖业中的推广应用, 促进肉鸡生产迅速健康发展。

#### 参考文献:

- [1] 黄乔书, 吕归宝, 李雅臣, 等. 黄芪多糖的研究[J]. 药科学报, 1982, 17(3): 200.
- [2] 陈洪亮. 植物多糖的制备及对肉仔鸡免疫功能影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2002.
- [3] 高艳艳. 黄芪多糖增强疫苗免疫效力及机理研究[D]. 兰州: 中国农业科学院硕士学位论文, 2006.
- [4] 刘永杰, 李庆章, 郝艳红. 黄芪多糖和香菇多糖对雏鸡 IL-2 活性和淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(3): 89-91.
- [5] 高文学, 李庆章, 孟宪荣, 等. 黄芪多糖和香菇多糖对雏鸡 M $\Phi$  活性与 IL-1 体外诱生活性的影响[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(5): 39-40.
- [6] 李繁, 谢明权, 林辉环, 等. 免疫增强剂促进鸡球虫细胞免疫的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000(3): 37-40.
- [7] 章世元, 徐春燕, 董晓芳, 等. 苜蓿多糖和黄芪多糖对肉仔鸡淋巴细胞增殖的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(3): 670-674.
- [8] 胡文举, 宋艳画, 吴伶俐. 黄连素与黄芪多糖对 AA 肉鸡生长性能及免疫功能的影响[J]. 江苏农业科学, 2013(4): 209-211.
- [9] 李万坤, 郭福存, 赵兴绪. 天然免疫活性多糖替代抗生素添加剂的作用研究[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(1): 10-16.
- [10] 李树鹏, 郝艳霜, 陈福星, 等. 黄芪多糖和 2 株益生菌体外抑菌作用研究[J]. 河南农业科学, 2007(4): 88-90.
- [11] 胡文举, 宋艳画, 吴伶俐. 黄连素和黄芪多糖对鸡源大肠杆菌的体外联合抑菌作用[J]. 中兽医学杂志, 2013(6): 8-10.
- [12] 时秀梅, 王希敏, 高华方, 等. 复方黄芪多糖冲剂抗病毒效果试验[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(12): 39-41.
- [13] 任宇皓, 胡元亮, 刘家国, 等. 黄芪多糖、淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮对新城疫病毒感染细胞的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001(2): 105-108.
- [14] 侯卫东, 黎婧, 崔沛, 等. 板蓝根和黄芪提取液对鸡新城疫病毒在鸡胚上增殖的影响[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2010(1): 9-11.
- [15] 魏萍, 李庆章, 郝艳红. 黄芪多糖和香菇多糖对 VAMV 感染雏鸡免疫器官 LPO 含量的影响[J]. 中兽医医药杂志, 1999(3): 4-7.
- [16] 高学军, 李庆章, 葛铭, 等. 黄芪多糖和香菇多糖对 VAMV 感染雏鸡淋巴细胞化学发光的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1999(12): 5-6.
- [17] 郝艳红, 李庆章. 芪多糖和香菇多糖对 vMDV 所致雏鸡自由基损伤的保护作用研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999(6): 471-473.
- [18] 王志祥, 吕美, 戚鑫, 等. 黄芪提取物对肉仔鸡生长、免疫器官发育及抗氧化功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(17): 30-31.
- [19] 李亚杰, 赵献军. 益生菌·黄芪多糖微胶囊制剂对肉仔鸡生长性能·免疫器官指数及血液生化指标的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(1): 100-103.
- [20] 卢亚萍, 陈张红, 潘宏涛. 溶菌酶对肉仔鸡生长性能及免疫功能的影响[J]. 饲料研究, 2009(8): 50-52.
- [21] 赵云焕, 李迎晓, 焦凤超, 等. 黄芪多糖、益生菌对固始鸡生产性能和免疫效果的影响[J]. 江苏农业科学, 2012(9): 214-215.
- [22] 魏炳栋, 陈群, 于维, 等. 黄芪多糖对三黄肉鸡生长性能及肠道菌群的影响[J]. 中国饲料, 2013(17): 34-36.
- [23] 王虹玲, 刘丹丹, 姜诗文, 等. 复合微生态制剂与黄芪多糖对肉鸡生长性能、肠道菌群和免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2014(6): 17-21.

# 当前我国禽蛋生产形势分析及后期走势研判

虞 华<sup>1</sup>, 彭 莉<sup>2</sup>

(1. 国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005; 2. 江苏省统计局盐城调查局, 江苏 盐城 224005)

**摘 要:** 2013年以来, 禽流感肆虐对我国家禽养殖业带来灾难性影响, 表现为肉鸡、蛋鸡存栏量大幅下降、养殖户补栏意愿不强。虽然近期鸡蛋价格迅速走高, 但是养殖户对禽流感仍心有余悸, 补栏动作缓慢, 甚至有养殖户退出市场。预计禽蛋市场将在未来相当长的时期内处于供给偏紧的状态。

**关键词:** 禽蛋; 形势; 分析; 研判

**中图分类号:** S831.49

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0019-03

2013年以来, 严重的禽流感对我国家禽养殖业带来灾难性影响。尤其是今年年初, 肉鸡、蛋鸡存栏量均出现大幅下降。而禽流感的后遗症则是养殖户补栏行动不积极。与此同时, 国内白羽肉鸡行业因经营亏损、资金紧张等原因达成共识, 成立白羽肉鸡联盟缩减祖代鸡引种数量以及强制淘汰满50周龄的祖代鸡, 去产能趋势明显。而蛋鸡方面, 2013年11月份以来存栏量快速下滑。2014年7月份全国在产蛋鸡存栏量约为11.3亿只, 比6月份继续减少, 减少幅度为3.1%; 比2013年7月份减少21.5%。可见, 尽管最近几个月鸡蛋价格迅速走高, 但养殖户对禽流感仍心有余悸, 补栏动作缓慢, 部分养殖户甚至退出市场, 导致禽蛋市场将在未来相当长的一段时期内处于供给偏紧的状态。

## 1 前三季度国内禽蛋市场变化特点

2014年前三季度鸡蛋价格走势基本可以分为5个时期。受H<sub>7</sub>N<sub>9</sub>禽流感影响连续低迷了一年多的禽蛋类市场, 在经历春节和正月低谷期(1-2月份)后, 终于在3月份有了起色。往年8月份才会出现的禽、蛋供应紧张局面, 今年3月份就提前出现了, 禽价、蛋价因此迎来一波强劲反弹期(3~5月中旬)。5月20日广州市鸡蛋零售价格已经逼近14元/kg的高位, 全国鸡蛋价格普遍涨幅超过三成, 价格逼近历史高位。5月下旬之后因为缺乏供需关系变化的支持, 蛋价便在意料之中进入高位震荡调整期(5月下旬~7月底)。经过两个多月

的调整, 蛋价从8月开始再次走出一波上升行情, 进入冲高期(8月初~8月下旬)。鸡蛋市场价格经过“五连跳”, 基本实现全国性“破五”。8月25日全国鸡蛋平均出场价格涨到10.96元/kg, 创下历史新高。然而, 鸡蛋价格在中秋节前“冲六”不成, 出人意料地提前进入回调期(8月下旬~9月), 同时打破了多年来鸡蛋月度平均价格9月份最高的规律。

### 1.1 禽蛋价格淡季逆势上涨, 屡创新高, 蛋鸡“身娇蛋贵”

7月份以来, 全国鸡蛋价格上涨明显, 尤其进入8月份后, 涨势有所加速, 鸡蛋价格不断创下历史新高。全国监测数据显示, 8月25日鸡蛋全国平均出场价格一度达到5.48元/500g, 不少地区鸡蛋最高零售价格一度飙涨至7元/500g, 几乎是一天一个价, 涨得连蛋商都觉得“惊人”。2014年前三季度全国淘汰鸡平均出场价格9.56元/kg, 比2013年前三季度的8.23元/kg高出1.33元。其中:8月份均价最高, 达11.16元/kg; 2月份均价最低, 仅7.16元/kg(图1)。2014年前三季度全国鸡蛋平均出场价格为8.67元/kg, 比2013年前三季度的7.63元/kg高出1.04元。其中:8月份均价最高, 达10.34元/kg; 2月份均价最低, 仅6.94元/kg(图2)。

### 1.2 蛋鸡养殖效益转好, 三季度一路飘红

年初活禽、鲜蛋出现滞销, 价格下跌, 产品积

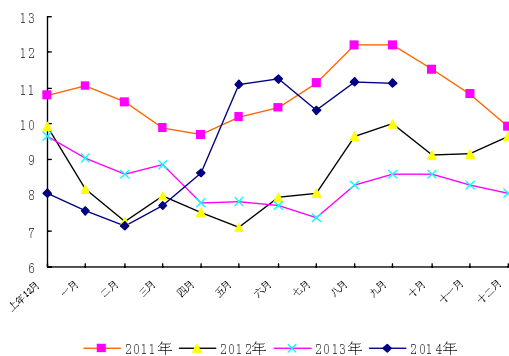


图1 2011年以来全国蛋鸡淘汰鸡出场价格走势(元/kg)

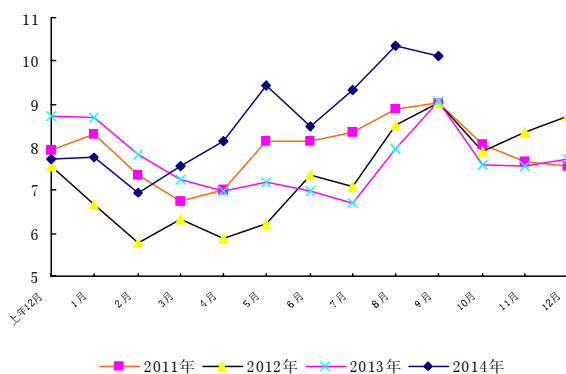


图2 2011年以来全国鸡蛋出场价格走势(元/kg)

压, 亏损严重, 导致养殖户不得不杀禽减苗、杀禽减损。3月份以后市场行情看好, 养殖开始效益转好。5月15日养殖户每500g鸡蛋可获得1元左右的收益, 罗斯308养殖户每只鸡可盈利6元左右。由于三季度均价与5月15日相当, 养殖户收益基本维持5月15日的水平。

### 1.3 玉米价格高, 养殖利润缩减

2014年4月中旬以来, 得益于国家临储政策垫底, 生猪价格逆市反弹, 鸡蛋价格高涨, 玉米行情持续升温, 8月下旬玉米现货价格已涨至2800元/吨左右, 突破2009年以来的历史最高水平。随着玉米价格上涨, 饲料价格也不断上涨。2014年以来, 豆粕价格虽有回落, 但仍处于较高水平。因此, 面对当前生猪价格和鸡蛋价格齐头并进的利好形势, 许多养殖户在欣喜之余略显惆怅。因为高涨的玉米价格正在严重侵蚀着畜产品价格上涨带来的利润空间, 养殖业依然处于亏损边缘。2014年前三季度全国玉米价格平均为2.43元/kg, 比2013年同期的2.34元/kg高0.09元; 9月25日

为2.69元/kg, 比2013年同日的2.36元/kg高0.33元。2014年前三季度全国豆粕价格平均为3.86元/kg, 比2013年同期的4.16元/kg低0.30元; 9月25日为3.64元/kg, 比2013年同日的4.46元/kg便宜0.82元(图3)。2014年9月第3周全国肉鸡配合饲料和蛋鸡配合饲料平均价格分别为3.48元/kg和3.21元/kg, 同比分别上涨1.5%和1.9%。

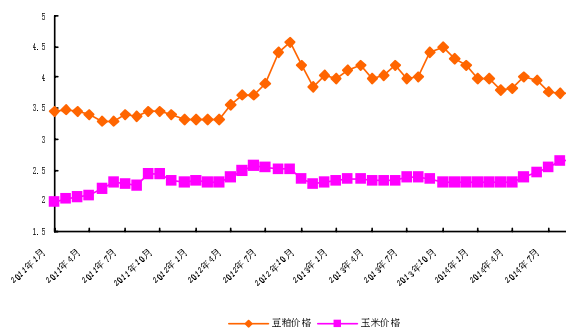


图3 2011年以来全国豆粕、玉米价格走势(元/kg)

## 2 鸡蛋价格屡创新高的主要原因

中秋国庆是我国鸡蛋传统消费旺季, 受到月饼消费和学生开学备货等因素影响, 9月份鸡蛋消费特别旺盛, 加之蛋鸡存栏量较低, 鸡蛋供不应求, 从而导致今年鸡蛋价格屡创历史新高, 主产区最高价格达到5.8元/500g。综合分析, 今年蛋价屡创新高升的主要原因是受此前禽流感后遗症影响。

### 2.1 蛋鸡存栏量低、产蛋数量少导致鸡蛋供应偏紧

自去年冬季开始, 国内家禽业再度遭受H<sub>7</sub>N<sub>9</sub>禽流感袭击, 而疫情持续到目前仍未彻底根治, 依然时有发生。这期间不但导致整个家禽养殖行业亏损严重, 不少养鸡户丧失信心, 而且也造成部分蛋鸡提前被淘汰并严重抑制了养殖户的补栏热情, 一些中小养殖户甚至永远退出该行业。不断减少的养殖户以及后期补栏跟不上导致前期国内鸡蛋供给量出现偏紧。

### 2.2 饲养成本增加推动

今年玉米、配合饲料价格上涨以及人工成本和储存成本增加推动了鸡蛋价格上涨。

### 2.3 H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 疫情对鸡蛋消费的负面影响逐步消散

随着人感染H<sub>7</sub>N<sub>9</sub>禽流感病例的减少, 对消费的负面影响逐步消散, 民众食用鸡蛋的恐慌情绪

也趋降,进而带动需求稳步回升。

#### 2.4 “节日效应”影响鸡蛋需求增加

每年的5月和9月,鸡蛋价格几乎都会出现很明显的高起波段,其原因主要是端午节和中秋节前消费者对鸡蛋需求的增加,这也在一定程度上加重市场供给偏紧格局。

而中秋节前禽蛋价格小幅回落主要原因在于:一是前期鸡蛋价格上涨较为迅猛,在一定程度上抑制了消费,给鸡蛋价格下跌留有充足的空间;二是今年补栏的雏鸡开始进入产蛋期,存栏增加,鸡蛋的库存量也增加,青黄不接的局面得到了缓解;三是天气转凉,舒适的气候使得蛋鸡产蛋率出现季节性恢复,供应强于前期;四是鸡蛋消费高峰期已过,加上南方雨水天气运输受阻,走货速度减缓,蛋价出现弱势下跌(图4)。



图4 2014年6月以来全国鸡蛋价格变化(元/500g)

### 3 四季度禽蛋市场价格走势判断

中秋过后,鸡蛋价格并没有像往年一样的大幅回落,只是稳步下调。主要原因也是因为目前在产蛋鸡存栏处于低位,节后蛋价高峰期已过,淘汰老鸡较多,鸡蛋供需稍显平衡。监测数据显示,与9月8日相比,9月25日,普通鲜鸡蛋全国日均价下降0.8%。分地区来看,超过六成省区市鸡蛋价格下降,多集中于东北、华北和华东地区,其中山东、江苏、上海、辽宁、吉林价格降幅居前,在4.4%~6.6%之间。一季度补栏蛋鸡逐步步入产蛋高峰,秋季气温凉爽,蛋鸡产蛋性能增强,鸡蛋供应紧张缓解,预计蛋价短期继续保持震荡下行局势。从近几年全国禽蛋市场价格走势变化规律看,每年春节后禽蛋价格一般都会回落,4-5月份都会上涨,6-8月出现震荡并上行,9月份前后达到全年最高点,之后开始回落,到元旦、春节前又会出现一次短暂回升。据分析,当前国内蛋鸡存栏量和正常年份相比仍然较低,后期蛋鸡补栏的速度估计也低于去年同期,鸡蛋新增供应量并不会对价格造成太大压力。四季度鸡蛋现货价格的低点出现在10月中下旬的概率极大,预计10月份主产区鸡蛋价格将大幅下滑,跌幅或超过2元/kg,均价可能达到8.6元/kg。总体来看,预计四季度鸡蛋现货价格先跌后涨,期货价格也将见底回升。

(上接第18页)

- [24] 谢明权,李繁,林辉环,等. 免疫增强剂对鸡球虫免疫保护力的作用[J]. 畜牧兽医学报, 2002(1): 94-100.
- [25] 王学斌,张志民,任向阳,等. 黄芪多糖油乳佐剂新城疫灭活苗对鸡免疫功能的影响[J]. 河南农业科学, 2007(4): 103-105.
- [26] 罗燕,谷新利,徐雷,等. 黄芪多糖分级组分对鸡疫苗免疫效果的影响[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(8): 45-47.
- [27] 杨松,王长月,何悦. 黄芪多糖对肉鸡禽流免疫效果的影响[J]. 饲料研究, 2012(8): 43, 52.
- [28] 陈强,徐阳,姜莉莉,等. 黄芪多糖对肉鸡新城疫免疫效果的影响[J]. 饲料研究, 2013(4): 59-60.
- [29] 赵天章,李慧英. 黄芪多糖对肉仔鸡生长性能和免疫功能的影响[J]. 饲料工业, 2014(2): 24-29.
- [30] 姜力,张明波,张颖,等. 黄芪多糖注射液对鸡传染性喉气管炎的防治试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1997(1): 26.
- [31] 刘永杰,李庆章,郝艳红. 香菇多糖和黄芪多糖对马立克氏

病强毒感染雏鸡白细胞介素2活性和淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(7): 3-5.

- [32] 刘利春,阴文奇. 复方黄芪多糖注射液对鸡传染性喉气管炎的治疗试验[J]. 四川畜牧兽医, 2006(10): 30-31.
- [33] 姜新发,吴晶娥,沈志华,等. 干扰素与黄芪多糖对鸡传染性囊病治疗效果[J]. 当代畜牧, 2008(8): 10-12.
- [34] 王俊丽,章世元,徐春燕,等. 黄芪多糖对肉仔鸡生产性能和部分免疫指标的影响[J]. 中国饲料, 2010(7): 18-21.
- [35] 金光明,赵桂芳,陈娟. 黄芪多糖对雏鸡生长性能的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2008, 22(4): 1-4.
- [36] 朱正生,郁杰,洪伟鸣,等.  $\gamma$ -氨基丁酸·黄芪多糖复方对肉雏鸡生长及免疫性能的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(19): 8894-8895, 9046.
- [37] 王学斌,陈功义,魏战勇,等. 黄芪多糖粉剂和注射剂对雏鸡免疫功能和生长的影响比较[J]. 中国家禽, 2007, 29(3): 21-23.

# 如何提高平养肉种鸡的受精率

韩文格

(河北飞龙家禽育种有限公司, 河北 石家庄 050091)

**摘要:** 针对目前平养肉种鸡受精率低下的现状, 结合今后肉种鸡的发展趋势, 本文通过详细讲解种公鸡各个阶段的管理方法, 以期达到提高受精率的目的。

**关键词:** 肉用种鸡; 受精率; 均匀度; 分饲

**中图分类号:** S831.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0022-02

随着肉鸡业的发展, 许多种鸡场膨胀扩张, 在设计饲养方式时大部分采用笼养。虽然大家都知道近几年招工困难和用工成本的提高, 但更担心的是采用平养方式所带来的受精率低这一难题, 因此迫不得已才选用笼养方式。同时, 我们在走访父母代种鸡客户时, 发现平养方式种鸡的受精率仅在 75%~93% 之间。低受精率确实给养殖业主带来了高额的成本和巨大的经济损失。为此, 笔者将不同阶段的公鸡管理要点总结如下, 以提高种公鸡的受精率。

## 1 育雏期

### 1.1 保持增重

雏鸡最初生长的前 3 天尤为重要。这不仅确定其免疫系统、心血管系统的发育和羽毛的生长, 更重要的是决定鸡只骨骼的发育。公鸡在早期的 4-6 周应有良好的体重和体型发育。4-6 周的实际体重最好超出标准体重 150 g 左右, 但不能超重过多, 否则不仅影响以后的受精率还会致使孵化率降低。只有公鸡在育雏期得到充分的发育才能为骨架和体型的良好发育奠定基础, 尤其是公鸡的胫骨长度和受精率呈正相关。即相同周龄的公鸡, 胫骨越长以后交配的成功率越高、受精率也越高。

### 1.2 提高均匀度

如果公鸡在 4 周末体重达标, 那么以后的均匀度就比较理想。只有保持较高的均匀度, 高受精率才有保障。影响均匀度的主要因素是公鸡能够吃到它所需的料量, 所以应提供合理的料位, 保证在同一时间为其提供准确的料量。为了控制体重

不超标太多, 在每只鸡每天采食料量达到 60 g 时, 通过降低光照的措施来限制公鸡的采食量。前 4 周最好采用全价颗粒料。饲料的营养成分最好含 19% 蛋白质和 1.1% 的赖氨酸。如在 5-6 日龄实施断喙, 应加倍小心。因为断喙失败是造成均匀度差的主要原因之一。断喙不当还会影响以后公鸡交配时固定母鸡, 导致交配失败, 受精率低。

## 2 育成期

**2.1** 在 5-12 周应确保体重按标准增长, 并保持垫料干燥平整。此阶段是公鸡肌肉、肌腱和韧带发育的关键时刻。在获得正常的体重增长的同时, 保证公鸡的均匀度尤为重要。日常生产中通过实施隔栏饲养、及时修喙、密度合理、按时选种、科学限饲、料位适宜等方法, 促使鸡群均匀度一直保持在 85%~90% 的较高水平。在 8 周前必须保证有良好的骨架发育。10 周后公鸡的生殖系统开始发育, 所以在 12 周龄前任何对生殖器官的损害都是不可逆转的。

**2.2** 在 13-20 周公鸡的睾丸开始发育并产生精子, 睾丸重量增加到 0.5~2 g。此时应保证 15-20 周的体重达标, 生殖系统的充分发育给第一次光照刺激的很好反应奠定基础。16 周后睾丸迅速发育, 如果体重超标, 也不能试图将它拉回标准, 否则会对睾丸造成永久性伤害, 影响公鸡的精子数量。应重新制定标准, 使新标准与原标准保持平衡。

**2.3** 在 20-24 周即加光后 2-3 周是睾丸发育的关键阶段, 此时 75% 的睾丸发育完成, 重量迅速增加到 25 g。如果此时周增重不达标, 将导致睾丸发育受损, 所以应确保每周有合适的周增重, 从而使公鸡



睾丸得到充分发育。在 18-23 周要减缓限饲强度,否则会对精子生产造成永久性伤害而影响受精率。

### 3 母鸡产蛋期

#### 3.1 混群

在公鸡转入产蛋舍前必须进行最后筛选。将体型发育好、羽毛覆盖好、腿脚强健无明显缺陷的公鸡于夜间均匀放入母鸡舍进行混群。混群时间不早于 6 周龄。在 13-15 周混群,错开 16-20 周生殖系统发育的关键时期,否则会严重影响以后的受精率。混群前要保证公母发育的一致性。如果同时转群,在母鸡转入的前一天将公鸡先转入产蛋舍,这样可以帮助公鸡提前熟悉饮水、采食和环境,为公鸡良好的周增重做好准备,否则严重影响早期和后期的受精率。

#### 3.2 公母分饲

为了继续控制公鸡体重,保证公鸡具备良好的交配条件,必须实施公母分饲并定期检查和维护分饲设备,防止母鸡偷吃公鸡料或公鸡偷吃母鸡料。定期淘汰弱残公鸡并及时减少这部分鸡的料位,保持料位合适。采用良好的饲喂系统保证所有的公鸡同时快速采食到饲料,确保每只鸡均能均衡地获取其所需要的营养。

#### 3.3 公母鸡混群时性成熟同步

45 周后受精率下降的主要原因是公母鸡在此之前发育不同步、性成熟不一致,导致公母分化。例:公鸡体况下降、均匀度变差,母鸡正常,或者母鸡体重过大,公鸡体况正常。到 45 周时公母分化强烈地表现出来,正常的交配活动、受精率随之大幅度下降。另外母鸡超重,体内脂肪堆积,输卵管内油脂太多,影响精子活力,也会引起受精率下降。

#### 3.4 保持公鸡体况

公鸡在母鸡产蛋期的料量应一直增加不能减少,公鸡体重和交配能力是确定料量的基础,合理增加料量保证公鸡每周增加 10~20 g 的体重。在母鸡产蛋期如果料量较低,公鸡体况不好,公鸡的羽毛会提前脱落,体重反而会增加,受精率降低。切记:公鸡不会因为超重而停止交配,往往是由于停止交配而超重的。当我们在定期称重后发现公鸡的饲料不足时,它摄入的营养就不够,那么公鸡的交配能力就下降,体重反而会增加。

#### 3.5 观察公母交配行为

每天下午是公母交配的高峰,随时观察它们的交配行为。如果公鸡性成熟早于母鸡,公鸡通常会表现好斗、追赶母鸡、母鸡躲在架板上或蛋窝下不敢与公鸡交配,影响受精率。反之,母鸡性成熟早于公鸡,公鸡会聚集在一起,藏于墙角、料桶或蛋窝下,不敢追赶母鸡与之交配。如果发生这些情况应立即采取相应措施,以避免受精率下降。

#### 3.6 每天监测饮水量

在温度适宜的情况下,母鸡产蛋期水料比是(1.8~2.2):1,结合鸡群饮水量并每天触摸鸡只嗉囊来确保鸡只饮水充足。如果公鸡饮水不足,它的交配欲望会降低,而母鸡饮水不足会长时间停留在架板上等水来,这样也会影响公母交配,从而降低受精率。

#### 3.7 加强垫料管理

垫料质量的好坏不仅影响舍内环境,最重要的是还会影响公鸡的腿部健康。当垫料潮湿板结时,会产生有害气体且病原微生物大量增殖;鸡只羽毛粘连污秽,鸡脚长时间接触垫料,病原通过脚垫上行感染,引发腿病,不利于交配。

#### 3.8 垫料上撒饲料吸引鸡啄食

每天下午早些时候在垫料上撒少量大颗粒的石灰石或破碎的玉米、谷物,吸引鸡只来啄食。在这个过程中,让公鸡充分展示它的领导角色,诱使母鸡愿意与之交配。

#### 3.9 保证鸡群中公鸡的有效比例

定期观察监测鸡群,不能使公鸡数量过多,数量多不等于质量好。过多的公鸡增加了它们之间的竞争,容易引起打斗,导致公鸡无暇顾及母鸡,减少交配几率。一般在 45 周后,替换一部分老的公鸡,有条件的间隔 8-10 周再替换新公鸡效果会更好。没有新公鸡时,也可以进行鸡舍之间的交换。每次替换 40% 的公鸡,它们在鸡群中形成新的社会关系,在重新确定社会关系和领地的过程中能提高公鸡的活力。

总之,随着工人工资的不断提高,并且许多年轻人越来越不想从事饲养工作,肉种鸡采用平养是今后发展的必然趋势,所以如何提高受精率是我们今后必须掌握的关键措施。只有在整个生产过程中,始终保持公母鸡良好的体况和同步发育,使之具有较好的交配行为,才能获得稳定的受精率。

# 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗与灭活疫苗的免疫效果评估试验

刘承军<sup>1</sup>, 王海丽<sup>2\*</sup>, 王 芸<sup>1</sup>, 刘万成<sup>1</sup>

(1. 聊城市畜牧兽医局, 山东 聊城 252000; 2. 聊城职业技术学院, 山东 聊城 252000)

**摘要:** 在相同饲养条件下, 对 35 日龄仔猪分别使用高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗与灭活疫苗进行免疫接种。在接种当天、接种后 28d、58d 分别检测高致病性猪蓝耳病免疫抗体水平。结果显示, 使用弱毒疫苗免疫的试验猪, 其高致病性猪蓝耳病抗体上升速度和抗体水平均优于使用灭活疫苗的试验猪。弱毒疫苗可在接种后 21~28d 产生免疫力, 免疫期为 4 个月。猪繁殖与呼吸综合征流行地区应该首先考虑使用弱毒疫苗。

**关键词:** 高致病性猪蓝耳病; 疫苗; 抗体; 监测; 防控

**中图分类号:** S851.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0024-02

## Evaluation of Highly Pathogenic PRRS Attenuated Vaccine and Inactivated Vaccine

Liu Chengjun<sup>1</sup>, Wang Haili<sup>2\*</sup>, Wang Yun<sup>1</sup>, Liu Wancheng<sup>1</sup>

(1. Liaocheng Animal Husbandry And Veterinary Bureau, Liaocheng 252000, China; 2. Liaocheng Vocational & Technical College, Liaocheng 252000, China)

**Abstract:** 35 day-old piglets were respectively immunized with highly pathogenic PRRS attenuated vaccine and inactivated vaccine. The immune antibodies were checked, which were collected from 0, 28, 58 day-post-immunization (dpi). The results showed that after using PRRS attenuated vaccine, the immune antibodies to PRRS were induced higher and faster than that of inactivated one. And the attenuated vaccine could induce immunity 21~28dpi, persisting to 4 months. So porcine reproductive and respiratory syndrome virus epidemic areas should firstly consider using attenuated vaccine.

**Key words:** Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome; vaccine; Antibody; Monitoring; prevention and control

高致病性猪蓝耳病又称“猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS)”, 是由编码 Nsp2 的基因上发生缺失的猪繁殖与呼吸综合征病毒变异毒株引起的一种猪只死亡率特别高、造成损失巨大的烈性传染病。该病病毒具有致病性强、传播迅速, 可以致使猪大批死亡, 尤其以仔猪最为明显。为进一步做好高致病性猪蓝耳病防控工作, 科学制定免疫程序, 避免该病的发生和蔓延, 笔者在山东聊城地区一大型养猪企业饲养的 35 日龄仔猪中进行了高致病性猪

蓝耳病弱毒疫苗与灭活疫苗免疫效果对比实验, 并根据农业部《2014 年高致病性猪蓝耳病监测方案》中制定的标准, 对使用不同疫苗的仔猪抗体水平进行跟踪监测, 摸清两种不同疫苗抗体产生的规律, 分析制约免疫抗体水平的主要原因, 为合理选择疫苗类型和制定免疫方式及免疫时间等提供科学支持。

### 1 试验材料

#### 1.1 试验动物

收稿日期: 2014-09-28

\*: 通讯作者

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目 (J14LF56)

在山东聊城地区某猪业有限公司的某栋猪舍内选择同一日龄(35日龄)、相同批次、体形和体重基本相同的同品种仔猪160头,所有实验仔猪均未注射过任何高致病性猪蓝耳病疫苗。

### 1.2 试验疫苗

分别选取在山东省重大动物疫病疫苗招标中中标的国内4家厂家提供的高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗和灭活疫苗。4家企业弱毒疫苗的标号分别用A、B、C、D表示,4家企业灭活疫苗标号分别为E、F、G、H表示。

### 1.3 检测所用试剂盒

使用“猪繁殖与呼吸综合征”检测试剂盒,法国LSI,批号为2-TTVETPRA-40。

## 2 试验方法

### 2.1 试验动物分组

160头35日龄仔猪均未进行过高致病性猪蓝耳病免疫,试验前所有猪都表现健康状态。将160头猪随机分为8组,每组平均20头。分别使用A、B、C、D弱毒疫苗对其中4组仔猪在35日龄时进行免疫注射,剂量1头份/头。分别使用E、F、G、H灭活疫苗对剩余的4组仔猪在35日龄时首免,65日龄时二免,剂量均为2 mL/头。

### 2.2 临床观察

组织人员对注射疫苗后猪的表现状况进行观察,并详细记录猪只的饮食状况、精神状态、有无免疫副反应等项目。

### 2.3 样品采集

在接种当天、接种后28d(63日龄)、58d(93日龄)采集各组接种猪血样,分离血清后低温保存。

### 2.4 抗体检测及结果判定

按照LSI猪繁殖与呼吸综合征检测试剂盒所提供的说明书操作步骤和注意事项进行操作。免疫抗体效价用IRPC值表示, $IRPC = [(样品 OD_{450} - 阴性对照平均值 OD_{450}) / (阳性对照平均值 OD_{450} - 阴性对照平均值 OD_{450})] \times 100$ 。当 $IRPC > 20$ 样品为阳性,当 $IRPC \leq 20$ ,样品为阴性。

## 3 结果

### 3.1 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗免疫抗体水平

首免当天,A、B、C、D四组仔猪母源抗体水平平均IRPC都处于40以下。疫苗接种后28d(63日龄),4组平均IRPC都稳步提升;接种后58d

(93日龄),A、B组平均IRPC仍处于上升的水平,但是C、D组的平均IRPC水平却呈现下降的态势(见表1)。

表1 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗试验各组IRPC变化情况

弱毒疫苗	35日龄 (免疫当天)	63日龄 (免疫后28d)	93日龄 (免疫后58d)
A组	5.3±7.546	175.866±76.123	195.766±91.258
B组	13.524±45.921	195.352±95.036	196.386±80.215
C组	27.313±49.935	246.359±33.201	239.368±41.268
D组	23.593±39.021	258.993±24.658	239.251±29.665

使用弱毒疫苗的4个试验组的猪抗体合格率在免疫后均呈现上升的趋势。4个试验组在35日龄(首免当天)抗体合格率处于9%~41%;免疫后28d,抗体合格率处于90.11%~100%之间;免疫后58d,C、D两组的抗体合格率达到100%,B组抗体合格率98.30%,A组抗体合格率为92.18%(表2)。

表2 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗弱毒疫苗试验各组抗体合格率(%)

疫苗	35日龄 (免疫当天)	63日龄 (免疫后28d)	93日龄 (免疫后58d)
A组	9	92.00	92.18
B组	17	90.11	98.3
C组	41	100	100
D组	36	95.63	100

### 3.2 高致病性猪蓝耳病灭活疫苗免疫抗体水平

E、F、G、H四组首次免疫当天仔猪母源抗体平均IRPC值都处于26以下水平。63日龄时(首免后28d),4个试验组平均IRPC水平都稳步提升且提升幅度非常明显,93日龄(首免后58d),4个试验组的平均IRPC仍处于上升态势,其中以G组最为明显,水平最高,E组最低。(见表3)

使用灭活疫苗的4个试验组猪的抗体合格率在首免后同样都呈现上升的趋势。4个实验组在35日龄(首免当天)抗体水平合格率处于9%~28%之间;首免后28d,抗体合格率处于35.80%~50.10%之间;首免后58d,抗体合格率处于70.96%~75.26%之间(见表4)。

(下转第28页)

# 生猪漂白粉中毒的病理变化观察

彭南秀, 肖杰\*, 邱永光, 蔡天城, 黄森  
(广州市动物卫生监督所, 广东 广州 510440)

**摘要:** 一屠宰场待宰生猪发生疑似中毒情况。病猪呕吐, 咳嗽, 呼吸急促, 个别口吐白沫; 剖检见气管中充满泡沫状分泌物, 肺脏肿胀; 病理组织学观察见肺充血、水肿, 部分肺泡呈代偿性扩张。调查分析认为中毒为漂白粉所致。

**关键词:** 生猪; 漂白粉中毒; 病理变化

**中图分类号:** S856.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0026-03

漂白粉是一种广谱消毒剂, 漂白粉消毒的氧化作用能杀灭化脓性球菌、细菌芽胞和肠道致病菌, 可对饮用水和废水进行杀菌, 适用于公共场所餐馆、医院、传染病疫源地及卫生洁具的消毒<sup>[1]</sup>。因其具有低毒高效且不污染环境的特点, 应用极为广泛, 但极少发生漂白粉中毒的现象。

1993年陈永德等<sup>[2]</sup>报道有人误食漂白粉中毒, 1998年李兴福<sup>[3]</sup>和2006年秦华等<sup>[4]</sup>报道肉仔鸡漂白粉中毒, 但未见有生猪漂白粉中毒的报道。

## 1 基本情况

2014年1月15日, 某食品公司的100头生猪进入广州市白云区某屠宰场, 卸车前经动物卫生监督机构驻场官方兽医检查验证猪只均健康。卸车进入猪舍后20 min, 该批生猪开始出现死亡, 15 min内, 死亡5头, 另有20头生猪出现中毒症状, 24 h内生猪共死亡16头。

现场检查发现该批生猪体温正常, 粪便未见异常, 口蹄部未见水泡和溃烂, 颈下咽喉部未见红肿等异常情况。屠宰场的猪圈有很浓的刺激性气味, 整个圈舍可见呕吐物。呕吐物呈粥状, 混有饲料和黏液, 有的呕吐物呈黄绿色。检查可见发病生猪精神沉郁; 可视黏膜充血; 呼吸急促, 剧烈咳嗽。部分生猪皮肤发绀(图1a)。有个别猪只口吐白沫, 剧烈抽搐, 共济失调。

经询问货主得知, 工作人员在猪舍消毒时没有严格按消毒剂的使用说明书要求来配制漂白粉

消毒液, 而是随意进行配制, 且在生猪进入猪舍前未将多余的漂白粉消毒液冲洗干净。生猪在经过长途运输后进入栏舍, 呼吸到含高浓度游离氯的空气, 甚至部分舔食地面积水引发生猪死亡。

驻场官方兽医根据以上的临床检查情况和《生猪屠宰检疫规程》的相关规定, 排除该批生猪发生动物疫情的可能。于是, 将其余生猪转换猪圈并隔离, 连续两天供给净水, 患猪恢复正常。

## 2 病理学观察

现场剖检5头死亡猪, 详细观察并记录心、肝、脾、肺、肾、胃、淋巴结、气管、肠道等器官和组织的眼观病变, 随后, 立即取上述组织在10%中性福尔马林中固定, 脱水, 石蜡包埋, 3 μm厚度连续切片, H.E常规染色, 显微镜下观察并记录病理组织学变化。

### 2.1 剖检变化

死亡猪尸僵正常, 皮肤发绀。部分猪口鼻流出白色或粉红色泡沫状黏液。病变主要见于呼吸系统, 气管和喉头有出血点(图1b); 气管中充满泡沫状分泌物, 甚至可见血凝块(图1c); 肺脏体积显著肿大, 大范围淤血, 呈暗红色, 局部见有出血斑。其他脏器和组织未见明显病变。

### 2.2 病理组织学变化

死亡猪主要组织学病变集中在呼吸系统。可见局部区域肺泡腔充满粉红色均质浆液(水肿液)(图2a), 其间混有红细胞、脱落的肺泡壁细胞和

尘细胞;肺泡壁增厚,毛细血管以及小静脉、动脉显著扩张充血,部分肺泡呈代偿性扩张;细支气管内充满水肿液(图 2b)并混有脱落的少量细支气管上皮,管壁毛细血管也显著扩张充血。气管壁部分小动脉及静脉以及毛细血管扩张充血(图 2c),气管黏膜上皮的纤毛断裂脱落(图 2d),局部区域有少量假复层纤毛柱状上皮细胞脱落;肺部淋巴结内毛细血管扩张充血(图 2e),髓质区见有多量的嗜酸性粒细胞浸润(图 2f)。其他器官未发现明显组织病理学改变。

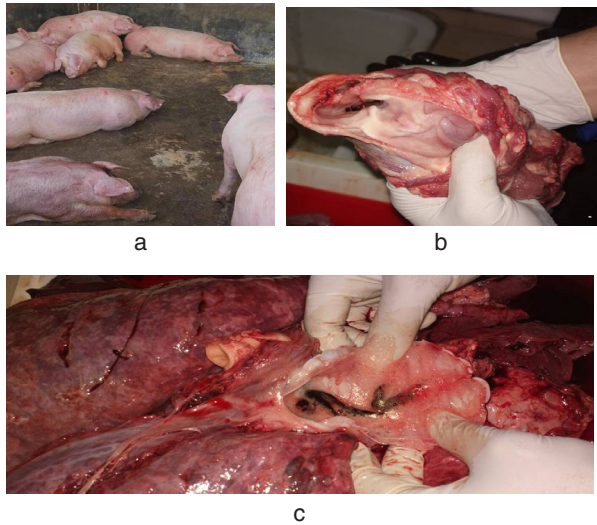


图 1 生猪临床及解剖变化

a. 生猪精神沉郁,呕吐。b. 喉头出血。c. 肺水肿,气管可见血凝块。

### 3 实验室检验

#### 3.1 漂白粉消毒液有效氯的测定

用间接碘量法<sup>[5]</sup>测定此次所用消毒液中有有效氯的含量。含氯消毒剂在酸性条件下水解产生次氯酸(HClO),并氧化碘化钾而释出等量碘;再用硫代硫酸钠溶液与碘作用,根据所消耗硫代硫酸钠的量,间接换算得出有效氯的含量。经实验室检查,此次消毒用的漂白粉消毒剂有效氯含量为 18 g/L。

#### 3.2 细菌培养

分别取死猪肠胃内容物、气管分泌物和肝、肺、肾组织接种琼脂培养基,经 37 °C,培养 24 h 后,挑取培养物涂片,革兰氏染色后镜检。细菌培养后未发现任何杆菌和链球菌。

### 4 讨论

#### 4.1 漂白粉主要是通过化学反应产生 HClO,靠

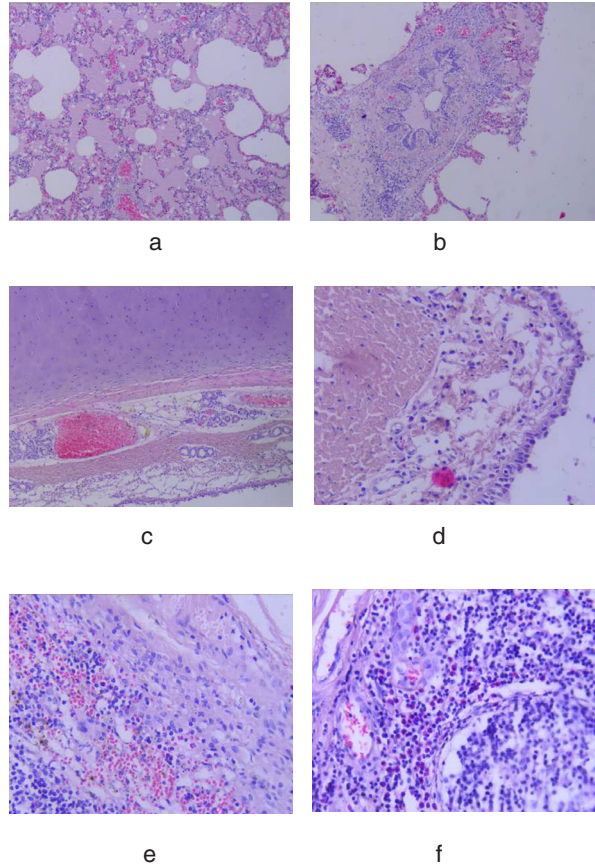


图 2 病理组织学变化

a. 肺水肿,肺泡壁增厚,毛细血管充血(HE × 100); b. 支气管充满水肿液(HE × 100); c. 气管黏膜层充血(HE × 100); d. 气管上皮纤毛萎缩消失(HE × 400); e. 淋巴结血管充血(HE × 400); f. 淋巴组织嗜酸性粒细胞浸润(HE × 400)。

其强氧化性实现杀菌。而 HClO 有剧烈的刺激性,对呼吸道黏膜和皮肤有直接刺激作用而引起炎症改变。病理组织观察显示,死亡猪的肺泡结构被破坏,明显淤血,有严重的肺水肿。其病理基础可能是肺内炎症细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞)为主导的肺内炎症介质反应失控,导致肺泡毛细血管内皮损伤使肺毛细血管通透性增高<sup>[6]</sup>,肺泡上皮细胞受损,进而大量水分和少量红细胞自血液中漏出,致大部分肺泡功能丧失引起急性肺损伤而导致全身缺氧死亡,这可能就是漂白粉能引起中毒的机理。漂白粉中毒的临床症状和病理组织学变化与氯气中毒都很相似<sup>[7-8]</sup>。氯气中毒能刺激迷走神经引起反射性心脏骤停而导致猝死<sup>[9]</sup>,但生猪漂白粉中毒死亡是否有类似的机制,尚待进一

步研究。

4.2 实验室细菌培养结果显示,死亡生猪肠道细菌未见特殊细菌,进一步排除了此批生猪猪链球菌、猪传染性胸膜肺炎和猪肺疫感染而引起的呼吸道疾病的可能。综合病史调查、临床症状、病理剖检和病理组织学观察的结果可以诊断生猪的死因是漂白粉中毒。

4.3 有效氯含量测定显示使用的漂白粉消毒液有效氯含量为 18%,而漂白粉消毒的目的浓度有效氯为 1%~3%<sup>[4]</sup>。科学的消毒是预防和控制屠宰场内动物疫病发生的关键。此次中毒事件由于工作人员缺乏消毒常识,过量使用消毒剂所致。教训是深刻的。

参考文献:

[1] 陈明中,吴心勤,蔺红光.漂白粉消毒剂的毒性测试[J].海峡

预防医学杂志,2013,19(2):60-61.

[2] 陈永德,谢茂惠,刁礼明,等.漂白粉所致食物中毒[J].公共卫生与预防医学,1993(4):9,18-19.

[3] 李兴福.使用漂白粉饮水消毒不当造成AA肉仔鸡中毒[J].中国禽业导刊,1998(1):49.

[4] 秦华,李凤龙.一例肉仔鸡漂白粉消毒剂中毒的诊治[J].中国家禽,2006,28(23):57.

[5] 卫生部卫生法制与监督司.消毒技术规范[S].2002.

[6] 钱桂生.急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征的诊治现状[J].新医学,2005,36:483-485.

[7] Gunnarsson M,Walther SM,Seidal T,et al.Effects of inhalation of corticosteroids immediately after experimental chlorine gas lung injury [J].J Trauma,2000,48(1):101-107.

[8] 张晓迪,赵琰,李文丽,等.红景天苷对氯气致大鼠肺损伤的保护作用[J],预防医学情报杂志,2013(29):269-272.

[9] 李云,崖琳,沙玲.急性氯气中毒的抢救与护理[J].Today Nurse,2014(2):82-83.



(上接第 25 页)

表 3 高致病性猪蓝耳病灭活疫苗试验各组 IRPC 变化情况

灭活疫苗	35 日龄 (首免当天)	63 日龄 (免疫后 28d)	93 日龄 (免疫后 58d)
E 组	6.562±18.206	12.984±20.369	33.873±30.052
F 组	10.985±22.023	36.624±44.025	70.325±52.012
G 组	24.569±40.236	102.62±107.536	159.231±80.421
H 组	10.685±26.123	31.923±28.635	70.342±52.081

表 4 高致病性猪蓝耳病灭活疫苗试验各组抗体合格率(%)

疫苗	35 日龄 (首免当天)	63 日龄 (免疫后 28d)	93 日龄 (免疫后 58d)
E 组	12	35.80	71.69
F 组	28	40.26	70.96
G 组	22	50.10	75.26
H 组	19	48.26	72.56

3.3 免疫副反应观察记录

高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗免疫后,没有发现明显的副反应症状。高致病性猪蓝耳病灭活疫苗免疫后,部分猪出现精神沉郁、采食下降等副反应症状,个别猪体温稍有升高,但很快恢复正常。

4 讨论

4.1 试验结果显示,高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗和灭活疫苗在免疫后 58d,8 组试验猪的平均抗体水平平均达到国家规定的“免疫抗体合格率全年保持在 70%以上”的基本要求。但通过表 2、表 3 数据我们发现,使用弱毒疫苗的猪的抗体合格率均在 92.18%以上,比使用灭活疫苗的任何一组都高。表明弱毒疫苗免疫效果明显优于灭活疫苗。弱毒疫苗产生抗体的速度要明显比灭活疫苗快。使用弱毒疫苗免疫后 28d,4 组试验组的抗体合格率均在 90.11 以上,部分试验组达到 100%;但使用灭活疫苗免疫后 58d 的 4 试验组抗体合格率均低于 50.1%。

弱毒活疫苗只需要免疫 1 次(1 头份/头)就可以达到比较高的免疫抗体合格率,而灭活疫苗必须免疫 2 次才能达到国家要求的抗体水平(70%以上)。

4.2 弱毒活苗因具有安全性好、副反应低、免疫应答好等优点,在高致病性猪蓝耳病流行地区,应该首先考虑使用弱毒疫苗。对于种猪场、受该疫病威胁不大的猪场可以选择使用灭活疫苗,达到净化高致病性猪蓝耳病的目的。

## 广东地区近2年禽流感H<sub>9</sub>亚型HA基因的序列分析

卢受昇, 高慧敏, 邓国东, 孔令辰, 钟柳艳, 叶健, 孙彦伟\*  
(广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:** 通过对2013-2014年从广东地区养鸡场、活禽交易市场获得的12株禽流感H<sub>9</sub>亚型病毒的HA基因的序列分析, 发现当前流行的病毒主要属于H9.4.2.5分支。潜在的氨基酸糖基化位点有7~8个, 变异主要表现在HA蛋白的145-147 aa和313-315 aa处增加了2个位点。受体结合位点发生变化, 第198位aa由G变为L, 具有可感染人的分子特征。以上基因变化提示当前毒株具有了致病力增强的分子基础, 且其与疫苗株有较大的差异, 提示现有的疫苗不能提供较有效的保护。

**关键词:** 禽流感病毒; H<sub>9</sub>亚型; HA基因; 序列分析

**中图分类号:** S858.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0029-04

## Analysis of Hemagglutinin Genes of Avian Influenzavirus H<sub>9</sub> Subtype Isolated from Guangdong Area in 2013-2014

Lu Shousheng, Gao Huimin, Deng Guodong, Kong Lingchen, Zhong Liuyan, Ye Jian, Sun Yanwei\*  
(Guangdong Institute of Animal Health Supervision, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** In this study, twelve HA genes of avian influenza viruses (AIVs) H<sub>9</sub> subtype were sequenced, which were isolated from farms or live poultry markets between 2013 and 2014 in Guangdong area. Phylogenetic analysis showed that only one isolate from 2013 belonged to h9.4.2.6 branch, the other 11 isolates belonged to h9.4.2.5 branch. The number of amino acid potential glycosylation sites were 7-8. Two sites were added in aa 145-147 and aa 313-315, compared to the reference strains and vaccine strains. The 198th aa in receptor binding sites was changed from G to L, which was recognized to have the molecular characteristics of the potential ability to infect human beings. The above changes in the molecular basis of the current strains indicated that their pathogenicity would be strengthened, and their great differences from vaccine strains would explain the causes of vaccination failures.

**Key words:** Avian Influenza; H<sub>9</sub> Subtype; HA Gene; Sequence Analysis

禽流感(Avian Influenza, AI)是由A型流感病毒(Influenza Virus)引起的一种禽类传染性疾病, 该病严重危害禽类健康和公共卫生安全。根据禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)的HA基因, 可将其分为17个亚型。当前我国流行的亚型有H<sub>5</sub>、H<sub>7</sub>、H<sub>9</sub>亚型禽流感。其中H<sub>9</sub>亚型禽流感最早于1966年在美国被分离到, 1994年广东首先在全国分离到该病毒<sup>[1]</sup>。近年来, 该病毒在鸡群中广泛存在。随着时间的推移, 其临床表现也发生了一定的变化, 当前以引起呼吸道症状为主。疫苗免疫效果不理想。本文旨在通过对当前流行毒株

HA基因的序列测定, 了解其变异情况, 为防控措施的制定提供科学依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品** 气管组织1份, 来源于2013年某鸡场35天龄麻黄鸡; 拭子样品11份, 于2013-2014年期间, 在3个市的大型活禽批发市场中采集。

**1.1.2 试剂** 抽提试剂RNAiso Reagent、一步法RT-PCR扩增试剂(PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit)和载体PMD-18T、DH5α感受态细胞,

收稿日期: 2014-10-08

\*: 通讯作者

均购自宝生物工程(大连)有限公司。回收试剂盒 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, 为 Promega 公司产品。

1.1.3 HA 基因的扩增引物 上游引物 P1:5'-tattcgtctcaggagcaaagcagggg-3'; 下游引物 P2:5'-atatcgtctcgtatttagtagaacaagggtgtttt-3', 参考 E. Hoffmann<sup>[2]</sup>设计, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取 按 RNAiso Reagent 操作说明书进行。

1.2.2 HA 基因的扩增 上、下游引物(25 μM)各 1 μL、2 × Buffer 25 μL、PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μL、DEPC 水 11 μL 和所提取的病毒 RNA 10 μL, 体系共 50 μL。反应程序为 50°C 30min, 95°C 2min, 然后 95°C 30s, 58°C 30s, 72°C 2min, 30 个循环, 72°C 延伸 8min。

1.2.3 PCR 产物的回收和转化 PCR 产物电泳后, 切下目的片段, 按试剂盒使用说明书进行回收。与载体 PMD-18T 进行连接, 转化进 DH5 α 感受态细胞中。

1.2.4 目的基因的核苷酸序列测定和分析 将阳性菌株送上海立菲生物工程有限公司进行测序, 结果用 DNASTAR 软件进行序列拼接, 并与下载自 GenBank 的 19 株 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型禽流感病毒 HA 基因组序列进行比较, 采用 MEGA 5.0 软件绘制其 HA 基因组的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 HA 基因扩增结果

12 个毒株均扩增出大小约 1 700 bp 的特异性条带, 与设计预期相符。见图 1。

2.2 HA 基因遗传进化分析

根据 Wenming Jiang 等<sup>[3]</sup>基因进化树等分类体系分析, 有 11 个毒株属于 H9.4.2.5 分支, 毒株

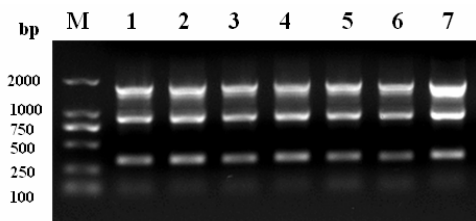


图 1 PCR 扩增结果

M: DNA Marker DL2000; 1-7: 部份样品扩增结果

间的相似性较高, 介于 94.7%~99.8%; 另有 1 个毒株(A/chicken/SZ/19/2013)属于 H9.4.2.6 分支, 与其他 11 个毒株间的相似性为 85.5%~86.8%。2 个疫苗毒株 A/chicken/Shandong/6/96、A/Chicken/Guangdong/SS/94 则属于 H9.4.2.2 分支。H9.4.2.5 分支的 11 个毒株与以上 2 个疫苗株的相似性分别为 88.8%~89.1%和 89.1%~90.3%; H9.4.2.6 分支的 1 个毒株与以上 2 个疫苗株的相似性分别为 89.8%和 90.7%。流行毒株与疫苗毒株处于相距较远的 2 个分支上, 相似性差异达 10%左右。见图 2。

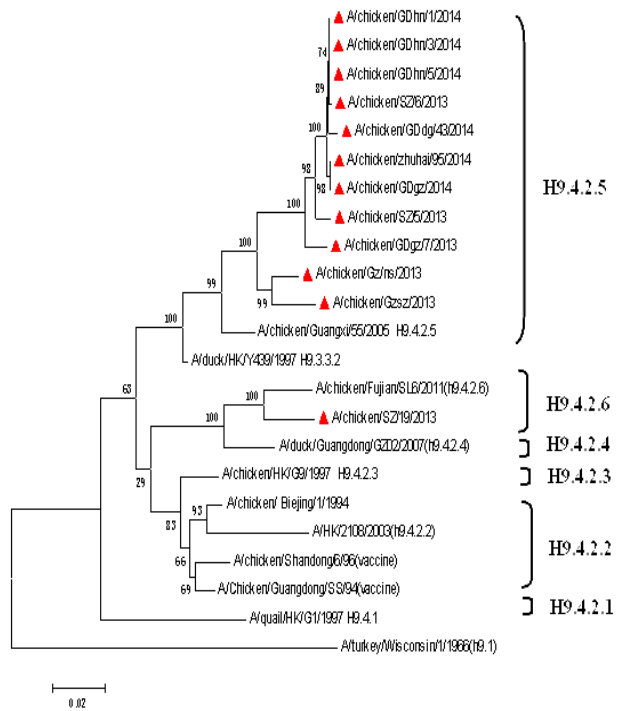


图 2 H<sub>9</sub> 亚型 AIV HA 基因的系统进化树

2.3 HA 基因氨基酸序列分析

12 株病毒的 cDNA 均包含了一个完整的开放阅读框架(ORF), 编码区长 1 683 bp, 共编码 560 个氨基酸(aa), 包括信号肽(1-16aa)、HA1 (19-337aa)、HA2 (339-560aa) 和一个精氨酸(338aa)。

2.4 糖基化位点分析

氨基酸序列分析结果表明, HA 基因的糖基化位点分别位于 29-31、141-143、145-147、218-220、298-300、305-307、313-315、492-494、551-553 位



aa 等 9 个位点上;位点 1-7 位于 HA1,位点 8-9 位于 HA2。12 个毒株的糖基化位点个数为 7~8 个,其中 2 株具有 7 个糖基化位点,另 10 株则具有 8 个糖基化位点。与参考毒株 A/quail/HK/G1/1997 (H9. 4. 1)、A/quail/HK/G1/1997 (H9. 4. 1)、A/duck/HK/Y439/1997、A/chicken/Fujian/SL6/2011 (h9.

4. 2. 6) 及疫苗毒株 A/Chicken/Guangdong/SS/94、A/chicken/Shandong/6/96 相比,近期广东地区毒株在糖基化位点上发生了一些变化。主要表现在 145-147aa、313-315 aa 处增加了 2 个位点,而 218-220 aa 位点出现了缺失。2014 年分离株均出现了以上一致的变化。详见表 1。

表 1 潜在糖基化位点分析

序号 <sup>1)</sup>	毒株名称	潜在糖基化位点								
		29-31	141-143	145-147	218-220	298-300	305-307	313-315	492-494	551-553
1	A/chicken/Biejing/1/1994	NST	NVT	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
2	A/quail/HK/G1/1997 H9. 4. 1	NST	NVT	—	NRT	NST	NIS	—	NGT	NGS
3	A/duck/HK/Y439/1997	NST	NVT	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
4	A/chicken/HK/G9/1997 H9. 4. 2	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
5	A/chicken/Guangxi/55/2005 H9. 4. 2. 5	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
6	A/chicken/Guangdong/TZH/2011H9. 4. 2	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
7	A/chicken/Fujian/SL6/2011 (h9. 4. 2. 6)	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
8	A/chicken/Guangxi/55/2005 (h9. 4. 2. 5)	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
9	A/duck/Guangdong/GZ02/2007 (h9. 4. 2. 4)	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
10	A/chicken/Shandong/6/96	NST	NVS	—	—	NTT	NVS	—	NGT	NGS
11	A/Chicken/Guangdong/SS/94	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	—	NGT	NGS
12	A/chicken/SZ/19/2013	NST	NVS	—	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
13	A/chicken/Gz/ns/2013	NST	NVS	—	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
14	A/chicken/Gzsz/2013	NST	NVS	—	NRT	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
15	A/chicken/SZ/5/2013	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
16	A/chicken/SZ/6/2013	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
17	A/chicken/GDgz/7/2013	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
18	A/chicken/GDdg/43/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
19	A/chicken/zhuhai/95/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
20	A/chicken/GDga/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
21	A/chicken/GDhn/1/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
22	A/chicken/GDhn/3/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS
23	A/chicken/GDhn/5/2014	NST	NVS	NGT	—	NTT	NVS	NCS	NGT	NGS

1): 序号 1-11 为参考毒株,12-23 为本次测定毒株。

### 2.5 裂解位点与受体结合位点分析

裂解位点序列分析发现,所有毒株均为 RSSR ↓ GL F,均为低致病性 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒特征。构成受体结合位点的 7 个氨基酸(109aa、161aa、163aa、191aa、198aa、202aa、203aa),其组成为 YWTNA(M/T)L Y。与以往的毒株相比,当前毒株的变化主要发生在 198 aa,其它位点在所有毒株中都是相对保守的。2013 年的 A/chicken/SZ/19/2013、A/chicken/Gz/ns/2013、A/chicken/Gzsz/2013 等 3 个毒株 198 aa 为 A,与以往的毒株相同,未发生改变;毒株 A/chicken/GDga/7/2013 为

M,2013 年另 2 个株毒株及 2014 年的 6 个毒株均变为 T。HA 蛋白的受体结合位点口袋右缘 146-150 位的序列非常保守,与参考株和疫苗株一致,均为 GTSKA;口袋左缘 232-237 位的序列 NGLQGR 则有一明显的变异发生,第 235 位 Q 被 M 所取代。详见表 2。虽然 226 位仍为 G,228 位仍为 R,未发生变化,但有研究<sup>[4]</sup>表明 234 位 aa 由 Q 突变成 L 后,能够使得病毒识别 SA α -2, 6Gal 受体,获得感染哺乳动物(包括人)的能力。本研究中的 12 个毒株的 HA 蛋白均有人样受体结合位点 (Leu<sup>234</sup>)特征,具有了感染人类的可能性。详见表 2。

表 2 裂解位点与受体结合位点分析

序号 <sup>D</sup>	毒株名称	裂解位点	结全部位右缘	受体位点(RBS)	结全部位左缘	其他重要位点	
			146-150	YWTN <u>TL</u> Y	232-237	226	228
1	A/chicken/ Beijing/1/1994	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWTN <u>V</u> L Y	NG <u>Q</u> QGR	Gln	Rly
2	A/quail/HK/G1/1997 H9. 4. 1	RSSR ↓ GLF	GIS <u>R</u> A	YWT <u>H</u> EL Y	ND <u>L</u> QGR	Gln	Rly
3	A/duck/HK/Y439/1997 H9. 3. 3. 2	ASNR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>H</u> EL Y	ND <u>Q</u> QGR	Gln	Rly
4	A/chicken/HK/G9/1997 H9. 4. 2	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
5	A/chicken/Guangxi/55/2005 H9. 4. 2. 5	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> TL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
6	A/chicken/Guangdong/TZH/2011H9. 4. 2	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
7	A/chicken/Fujian/SL6/2011(h9. 4. 2. 6)	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
8	A/chicken/Guangxi/55/2005(h9. 4. 2. 5)	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
9	A/duck/Guangdong/GZ02/2007(h9. 4. 2. 4)	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
10	A/chicken/Shandong/6/96	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>Q</u> QGR	Gln	Rly
11	A/Chicken/Guangdong/SS/94	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>Q</u> QGR	Gln	Rly
12	A/chicken/SZ/19/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> QGR	Gln	Rly
13	A/chicken/Gz/ns/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
14	A/chicken/Gzsz/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> AL Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
15	A/chicken/SZ/5/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
16	A/chicken/SZ/6/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
17	A/chicken/GDga/7/2013	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>M</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
18	A/chicken/GDg/43/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
19	A/chicken/zuhai/95/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
20	A/chicken/GDga/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
21	A/chicken/GDhn/1/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
22	A/chicken/GDhn/3/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly
23	A/chicken/GDhn/5/2014	RSSR ↓ GLF	GTSKA	YWT <u>N</u> <u>T</u> L Y	NG <u>L</u> <u>M</u> GR	Gln	Rly

1):1. 序号 1-11 为参考毒株,12-23 为本次测定毒株。2. 受体结合位点的氨基酸位置依次为:109aa、161aa、163aa、191aa、198aa、202aa 和 203aa。3. 加下划线的氨基酸为有差异的位点。

### 3 讨论

#### 3.1 当前毒株所处的分类地位

除 2013 年的 1 个毒株 (A/chicken/SZ/19/2013) 属于 H9. 4. 2. 6 分支外,近期的 11 个毒株均属于 H9. 4. 2. 5 分支,说明当前广东地区 H<sub>9</sub> 亚型禽流感优势流行株为 H9. 4. 2. 5 分支的毒株。而 2 个疫苗毒株 A/chicken/Shandong/6/96、A/Chicken/Guangdong/SS/94 则属于 H9. 4. 2. 2 分支,流行毒株与疫苗毒株处于相距较远的 2 个分支上。当前流行毒株与 A/chicken/Shandong/6/96 核苷酸相似性差异已达 10.1%~11.2%, 与 A/Chicken/Guangdong/SS/94 相比,相似性差异已到 9.3%~10.9%, 说明广东近期流行毒株与疫苗株已有较大的遗传差异。

#### 3.2 流行毒株致病性变化的分子基础分析

近期 H<sub>9</sub> 亚型禽流感临床上出现一些新的特征,表现为免疫保护水平不理想,有些场多次免疫

仍发病,且流行面广,以难以治愈的呼吸道问题为主。而本研究发现当前广东毒株在糖基化位点上发生了一些变化,主要表现在 145~147aa、313~315aa 处增加了 2 个位点,218-220 的位点出现了缺失。2014 年分离株均出现了以上一致性变化,特别是 145~147aa 处糖基化位点的增加,有增强其在鸡体内的复制能力。刘彦云等<sup>[5]</sup>研究表明该位点的变化,不但能延长感染鸡的排毒周期,且能加大排毒量。陈陆等<sup>[6]</sup>研究也有相近的结果,认为正是 145aa 发生漂变(S→N)这一位点的氨基酸漂变,导致抗原发生变异,增强了其对鸡胚的感染性和致病力,并缺失了与有关单抗结合的能力,证实某些重要氨基酸位点的变异能导致禽流感病毒的抗原性和致病性变异。近年广东毒株中一些重要氨基酸位点,特别是 145aa 糖基化位点的改变是导致免疫失败的主要原因之一。在当前 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型禽流感的防控

(下转第 41 页)

# 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗病毒培养条件的优化

周靓靓, 孙心, 吴蕾

(哈药集团生物疫苗有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150069)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)06-0033-03

猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪流行性腹泻病毒(PEDV)是引起猪病毒性腹泻的主要病原。猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻二联灭活疫苗应用于预防猪传染性胃肠炎(TGE)及猪流行性腹泻(PED)。在疫苗的生产过程中,要将形成良好单层的细胞进行传代,扩大培养后用TGEV和PEDV两种病毒按5%的接毒量分别感染相对应的ST细胞和Vero细胞单层,37℃条件下培养,繁殖病毒,待细胞病变(CPE)达到80%以上时收获含病毒细胞培养液,病毒液的含毒量应不低于 $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/mL。我们按照生产操作规程进行试验,小试阶段得到了良好的效果,但是在大批量试生产中有了细微的差异,阻碍大批量生产。针对生产过程中遇到的这些问题,做了疫苗病毒培养优化试验,使问题得到了解决,达到生产效价的要求。

## 1 材料

### 1.1 病毒

猪传染性胃肠炎(TGEV)(华毒株)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定、保管、供应。

猪流行性腹泻(PEDV)(CV777株)由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定、保管、供应。

### 1.2 细胞

Vero细胞、ST细胞购于中国兽医药品监察所。

### 1.3 营养液

生长液为含8%犊牛血清的MEM营养液;维持液为含2%犊牛血清的MEM营养液。营养液均含各2万单位/mL青链霉素,用7.5%的NaHCO<sub>3</sub>调整pH值至7.2~7.4。

### 1.4 主要试剂

MEM培养基和胰酶购自美国Gibco公司;进口

EDTA;犊牛血清购自内蒙古金源康生物工程有限公司;其它化学试剂均为分析纯,购于化学试剂公司。

## 2 方法

### 2.1 TGEV在ST与PK15细胞上的增值特性比较

当PK15、ST细胞长满单层时,接种TGEV,37℃吸附1h;加适量维持液,置于37℃培养箱中培养,每天观察CPE。当细胞出现80%~85%的CPE时收获病毒,置超低温冰箱保存,备用。

用MEM培养液将增殖好的病毒液作10倍系列稀释,即 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ …… $10^{-8}$ ,分别取100μL加至96孔细胞培养板孔中,每个稀释度作6个重复。然后,每孔加入100μL经胰蛋白酶-EDTA消化分散的ST及PK15细胞悬液,并设正常细胞对照。置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,逐日观察CPE和细胞对照,观察2~4d,记录出现CPE的孔数,并按照Reed-Muench法计算病毒液的半数组织培养感染剂量TCID<sub>50</sub>。

### 2.2 Vero及ST单层细胞制备的优化

**2.2.1 Vero细胞分散液的选择** 将Vero细胞分成两组,第一组用PBS+0.25%胰酶进行分散,第二组用0.02%EDTA+0.25%胰酶进行分散,传代后在相同的条件下进行培养,在培养24h及48h进行观察,比较两组分散液的分散效果。

**2.2.2 ST细胞消化时间的优化** 将形成良好单层的ST细胞分为2组,第一组消化5min,第二组消化35min,传代后在相同的条件下进行培养,在培养24h及48h进行观察,比较两组消化时间对细胞状态的影响。

### 2.3 接毒时间的优化

将TGEV与PEDV病毒液分别分为2组,第一

组选择培养 48 h 左右的细胞进行接毒,第二组选择培养 72 h 左右的细胞进行接毒,当病变程度达到 85%时,收获病毒液,分别测定病毒液的 TCID<sub>50</sub>。

### 3 结果

#### 3.1 TGEV 在 ST 细胞与 PK15 细胞上的增殖比较

利用 ST 增殖的 TGEV 病毒液的病毒滴度高于 PK15 细胞增殖的病毒滴度。因此选择用 ST 细胞

用于 TGEV 增殖。结果见表 1。

#### 3.2 Vero 及 ST 单层细胞制备

**3.2.1 Vero 细胞分散液的选择** 使用 0.02%EDTA+0.25%胰酶使单层细胞的消化时间缩短,培养 48 h 后细胞状态有了明显改观。做 3 个批次试验,试验结果见表 2。

**3.2.2 ST 细胞消化时间的选择** 消化时间 35 min,细胞培养后形成单层,分布均匀,细胞团少。

表 1 TGEV 病毒含量测定

项目	病变	TCID <sub>50</sub>
TGEV 在 PK15 细胞上的增殖特性	一般在接种后的 48~72 h 内才出现明显 CPE。细胞变圆,皱缩,胞浆内形成空泡,有的破碎崩解,部分细胞从单层细胞上脱落,使细胞单层形成网状。但延长培养时间,整个单层也不至于破坏。	10 <sup>5.8</sup> /mL
TGEV 在 ST 细胞上的增殖特性	一般在接种后 36~72 h 内可出现明显 CPE。细胞肿胀,胞浆内有颗粒样变性,细胞融合。姬姆萨氏染色可见细胞核内有许多颗粒。病变严重的细胞脱落。延长培养时间(4 d)可见整个细胞单层几乎完全从瓶壁上脱落。	10 <sup>8.0</sup> /mL

表 2 分散液对 Vero 细胞状态的影响

批次	细胞名称	分散液	消化程度	培养 24h 细胞状态	培养 48h 细胞状态
201101	Vero	PBS+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 60%,形态较长。	细胞形成单层,有细胞团,有死细胞。
	Vero	0.02%EDTA+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 65%,形态较长。	细胞形成单层,细胞团较少。
201102	Vero	PBS+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 65%,形态较长。	细胞形成单层,有细胞团,有死细胞。
	Vero	0.02%EDTA+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 70%,形态较长。	细胞形成单层,细胞团较少。
201103	Vero	PBS+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 65%,形态较长。	细胞形成单层,有细胞团,有死细胞。
	Vero	0.02%EDTA+0.25%胰酶	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 65%,形态较长。	细胞形成单层,细胞团较少。

做 3 个批次试验,试验结果见表 3。

#### 3.3 接毒时间的优化

细胞经 48 h 培养后形成单层时接毒,缩短了病毒繁殖时间,毒价达到要求。做 3 个批次试验,试验结果见表 4。

### 4 结语

经过试验,选择的工艺是:Vero 细胞采用

0.02%EDTA+0.25%胰酶为分散液,ST 细胞消化时间为 30~40 min,细胞培养 48 h 后接毒,CPE 应达到 85%时收获病毒液。按照前述的生产工艺,已生产 PEDV 疫苗原液 200 万 mL,TGEV 疫苗原液 200 万 mL,效价均达到 10<sup>7.17</sup>TCID<sub>50</sub>/mL 以上,生产工艺稳定,达到生产要求。

表 3 消化程度对 ST 细胞的影响

批次	细胞名称	分散液	消化时间	消化程度	培养 24h 细胞状态	培养 24h 细胞状态
201101	ST	EDTA-胰酶	5min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 65%,形态较长,分布不均匀。	细胞形成单层,分布不均匀,细胞团较多。
	ST		35min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 70%,形态较长,分布均匀。	细胞形成单层,分布均匀,细胞团少。
201102	ST	EDTA-胰酶	5min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 60%,形态较长,分布不均匀。	细胞形成单层,分布不均匀,细胞团较多。
	ST		35min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 70%,形态较长,分布均匀。	细胞形成单层,分布均匀,细胞团少。
201103	ST	EDTA-胰酶	5min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 60%,形态较长,分布不均匀。	细胞形成单层,分布不均匀,细胞团较多。
	ST		35min	细胞圆缩,转瓶表面出现划痕。	细胞数达 70%,形态较长,分布均匀。	细胞形成单层,分布均匀,细胞团少。

表 4 选择不同时间接毒对效价的影响

批次	细胞名称	培养时间(h)	细胞状态	毒种名称	接毒量	收毒时间(h)	病变程度	效价
201101	Vero	48	细胞刚形成单层	PEDV	5%	46	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	Vero	72	细胞形成致密单层		5%	64	85%	$10^{6.89}TCID_{50}/mL$
201102	Vero	48	细胞刚形成单层	PEDV	5%	46	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	Vero	72	细胞形成致密单层		5%	65	85%	$10^{6.89}TCID_{50}/mL$
201103	Vero	48	细胞刚形成单层	PEDV	5%	44	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	Vero	72	细胞形成致密单层		5%	68	85%	$10^{6.89}TCID_{50}/mL$
201101	ST	48	细胞刚形成单层	TGEV	5%	48	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	ST	72	细胞形成致密单层		5%	68	85%	$10^{6.64}TCID_{50}/mL$
201102	ST	48	细胞刚形成单层	TGEV	5%	48	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	ST	72	细胞形成致密单层		5%	67	85%	$10^{6.89}TCID_{50}/mL$
201103	ST	48	细胞刚形成单层	TGEV	5%	49	85%	$10^{7.17}TCID_{50}/mL$
	ST	72	细胞形成致密单层		5%	68	85%	$10^{6.64}TCID_{50}/mL$

## ·信息·

香港研究团队破解 H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 传染力强之谜

据香港《文汇报》报道,香港大学一项研究发现,H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 禽流感病毒的复制腿体系的 PB2 基因有多种类型的适应性变异,或可解释 H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 不同于其他禽流感病毒适应机制的原因,令它感染人的能力高于其他禽流感病毒。研究结果近期已在国际刊物《Nature Communications》上发表。

多种禽流感病毒在多个国家出现感染人类的病例,其中 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒已在全球令逾 600 人受感染,当中近半数为死亡病例;H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> 禽流感虽未引起严重病症,但血清学及病毒受体研究指病毒具有一定感染人类的能力。

香港大学医学院微生物学系副教授陈鸿霖,微生物学系讲座教授袁国勇带领的研究团队通过对 H<sub>7</sub>N<sub>9</sub>、H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒及 H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> 季节性流感病毒研究发现,不同禽流感病毒的复制腿体系的 PB2 亚基可能发生不同类型的适应性变异,令病毒能够在哺乳类动物,包括人的细胞中繁殖。

该项研究又发现,H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 禽流感病毒的复制腿体系的 PB2 基因有多种类型的适应性变异,或能部分解释 H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 禽流感病毒具有与其他禽流感病毒不同适应机制,令它感染人的能力高于其他禽流感病毒,从而发生人类感染并引起严重疾病。

研究亦进一步解开了禽流感病毒跨种感染及在人类细胞繁殖的必要条件,并为今后禽流感病毒监测提供了新的跨种感染、传播及宿主适应分子标记物。(信息来源:中国新闻网)

# 鸭瘟病毒 PCR 快速检测方法的建立

于新友<sup>1</sup>, 李天芝<sup>1</sup>, 刘吉山<sup>2</sup>, 沈志强<sup>1,2</sup>

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600)

**摘要:** 根据 GenBank 公布的鸭瘟病毒 UL30 基因保守序列设计了一对引物, 建立了检测鸭瘟病毒 PCR 方法, 并对其特异性、敏感性进行了研究。该 PCR 方法对鸭瘟病毒扩增结果为阳性, 对照毒株扩增结果均为阴性; 对鸭瘟病毒检测的灵敏性为 1 pg 总 DNA 量。以上结果表明该 PCR 方法特异性强、敏感性高、简便、快速, 可用于鸭瘟的早期确诊和病毒鉴定。

**关键词:** 鸭瘟病毒; PCR; 检测; 方法; 建立

**中图分类号:** S854.43

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0036-03

鸭瘟(Duck Plague, DP)是由鸭瘟病毒(DPV)引起的鸭、鹅等水禽的败血性、高度致死性传染病<sup>[1]</sup>。其特征为两腿麻痹、下痢、流泪和部分病鸭头颈肿大<sup>[2]</sup>。该病是危害养鸭业最严重的传染病之一<sup>[3]</sup>, 是 OIE 规定的 B 类传染病, 给世界各国养鸭业造成了较大的经济损失<sup>[4]</sup>。1923 年, Baudet<sup>[5]</sup>首次报道荷兰的家鸭暴发 DP。目前, 该病呈世界性分布。1957 年我国首次报道该病。检测 DPV 的常规方法有病毒分离、酶联免疫吸附试验和琼扩试验等。这些方法均有很多缺点: 如耗时长、检测敏感性较低及准确性差等, 尤其对处于潜伏期的鸭不能检出其体内的 DPV 感染。PCR 具有检测速度快、特异性好、灵敏度高优点, 已经广泛应用于细菌、病毒的诊断检测并展示其良好的应用前景。而应用 PCR 技术对 DP 进行诊断, 能快速地检测出是否有 DPV, 是常规检测方法无法比拟的。因此, 建立一种 DPV 的 PCR 检测方法对于 DP 的早期诊断, 防止 DP 的大规模爆发有重要的意义。

本研究根据 GenBank 公布 UL30 (EF554403) 基因序列, 设计 1 对特异性引物, 建立了一种特异、敏感的 DPV 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒株与病料

DPV、小鹅瘟病毒、鸭细小病毒、鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒、鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒和鸭副粘病毒由本实验室分离、鉴定、保存; 临床检测病料: 2014

年采自山东省各地鸭场临床诊断为 DPV 感染的鸭的肝脏、脾脏等。

### 1.2 工具酶及试剂盒

pMD18-T 载体、限制性内切酶、PCR 相关试剂、DNA Marker 和 DNA 凝胶回收试剂盒, 购自大连宝生物公司; AxyPrep 体液病毒 DNA 小量试剂盒从爱思进生物技术(杭州)有限公司购买。

### 1.3 PCR 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的 DPV 基因序列 (EF554403), 应用 Primer Premier 5.0 软件, 设计 1 对特异性引物, 扩增 DPV 的 UL30 基因 510 bp 部分片段。引物在生工生物工程(上海)股份有限公司合成。上游引物: 5'-CGACTACATCCATACCCACT-3', 下游引物: 5'-TATGCTTCAGCTAGAGTA-3'。

### 1.4 DPV 基因组 DNA 的提取

按 AxyPrep 体液病毒 DNA 小量试剂盒使用说明书提取 DPV 的 DNA, 并提取其他几种病毒的核酸。

### 1.5 DPV UL30 基因的 PCR 反应条件的确立

以提取的 DPV DNA 作为模板, 进行 PCR 反应, 扩增 UL30 基因。在其它条件不变的情况下, 对反应的退火温度进行优化, 分别采用 43℃, 45℃, 47℃, 49℃, 51℃, 53℃ 等 6 种不同的退火温度进行扩增; 在其它条件不变的情况下, 对反应的引物浓度进行优化, 分别采用 0.2 μmol/L, 0.4 μmol/L, 0.6 μmol/L, 0.8 μmol/L, 1.0 μmol/L, 1.2 μmol/L 等 6 种不同引物浓度进行扩增。反应体系保持为

收稿日期: 2014-10-20

基金项目: 山东省现代产业技术体系家禽创新团队生产与环境控制创新团队项目(SDAIT-13-011-10)

25  $\mu$  L, PCR 反应的条件保持不变, 为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 30S, 47 $^{\circ}$ C 30S, 72 $^{\circ}$ C 30S, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

### 1.6 PCR 扩增产物的检测及鉴定

取 5  $\mu$  L PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 紫外灯下观察扩增结果。如果有目的条带, 则切下目的条带, 按照 DNA 凝胶回收试剂盒的说明书操作, 回收目的片段 UL30。将回收后的 UL30 与 pMD18-T 连接。将连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5  $\alpha$ , 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后, 挑取单菌落摇菌过夜, 按质粒提取试剂盒的说明书抽提培养菌液的质粒, 用建立的 PCR 方法检测质粒是否含有 UL30 基因。如果含有 UL30 基因, 将提取的质粒发送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果与参照的 DPV 基因序列进行基因相似性分析。

### 1.7 特异性试验

分别提取鸭细小病毒, 鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒, 鸭圆环病毒, 鸭肝炎病毒, 小鹅瘟病毒, 鸭副粘病毒等 9 种不同的病毒核酸作为模板, 用已建立的 PCR 检测方法进行扩增。

### 1.8 敏感性试验

提取 DPV 基因组 DNA, 用仪器测定含量, 然后 10 倍系列稀释, 使 DPV 基因组 DNA 的含量分别为 10ng、1ng、100pg、10pg、1pg 和 0.1pg。分别将其作为模板, 用建立的方法分别进行 PCR 检测扩增, 确定 PCR 检测方法的敏感性。

### 1.9 重复性试验

为了验证所建立 PCR 检测方法的重复性, 分别提取 3 批 DP 阳性病料、阴性病料以及 6 种阴性对照病毒如鸭肝炎病毒、鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒、鸭副粘病毒、鸭细小病毒、鸭圆环病毒、小鹅瘟病毒的核酸作为模板, 进行 PCR 扩增反应。

### 1.10 临床样品的检测

提取临床上送检的 15 份 DP 疑似病料的基因组 DNA 作为模板, 用建立的 PCR 检测方法扩增检测, 测定并用生物学软件分析扩增产物的序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 扩增产物的检测

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 结果在 510 bp 出现目的 DNA 条带(图 1), 和预期大小一致(预期大小为 510 bp)。

### 2.2 特异性试验

利用所设计的引物及所确定的最佳反应条件

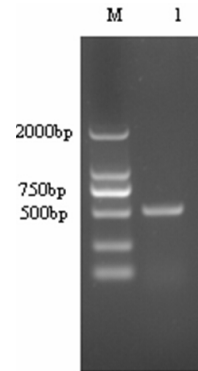


图 1 DPV 扩增结果

M: DL2000 MarKer, 1: DPV PCR 扩增结果

分别对 DPV、鸭细小病毒、鸭圆环病毒、小鹅瘟病毒、鸭肝炎病毒、鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒和鸭副粘病毒进行 PCR 扩增。结果 7 个毒株中只有 DPV 能扩增出相应的片段, 大小为 510 bp (预期 510 bp), 而其它均未扩增出相应的片段(图 2)。说明本研究建立的方法特异性好。

### 2.3 敏感性试验

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分别检测 5  $\mu$  L PCR 扩增产物, 5 份样品产物在 510 bp 位置均有目的条带, 与预期一致; 1 份样品产物无扩增条带。结果显示, 引物的检测灵敏度可达 1 pg DNA (图 3)。

### 2.4 重复性试验

重复性试验结果显示, 3 批不同的病料的检测结果相同, 说明建立的 PCR 检测方法重复性好、可靠、稳定。

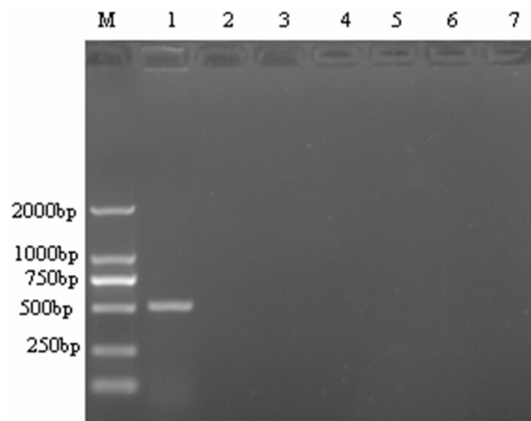


图 2 特异性试验结果

M: DL2000 MarKer, 1: DPV 扩增结果, 2: 鸭细小病毒扩增结果, 3: 鸭圆环病毒扩增结果, 4: 小鹅瘟病毒扩增结果, 5: 鸭肝炎病毒扩增结果, 6: 鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒扩增结果, 7: 鸭副粘病毒扩增结果。

## 2.5 扩增产物测序

测序结果见表 1。将本测序结果与参照的

DPV 基因序列进行基因相似性分析,其相似性为 100%。

表 1 扩增产物测序结果

CGACTACATCCATACCCACTGGACTACTTGTGATATGCTAGTTCAGGCTTTCCAGAAATTGGTAGATCA  
TGTTAAAGACAAACAGGCATATTCTGCCATGGTCATTTACGGAGATACCGATTCCGTGTTTGTTCGCAT  
TAAAGGAATCGCGCCGGAAGGTTTGTAGTGGCCGTTGGTGTATGCTATGGCCAGTATGATTACCCGAGAGT  
TATTCACCAGTCCGATAAAGCTAGAATGTGAGAAAACATTTTTTCAGATTGCTATTGATCACTAAGAAGA  
AATACATTGGGACTATTGTCGGCGGAAAAGATGATGATGAAAGGAGTTGACTTAGTCAGAAAAAACA  
CTGTAAATTCATTAATTATTATGCCAAACGACTCGTCGATCTTCTTTTTGGTAATGATGAAGTAGCTGCC  
GCGGCGGCAGCGATCTCAAAGGAACCAGCCAAAACATGGCTAGAGCGTTCCTTGCCCCCTGGTTTGG  
GTGAATTTGGCGCTACTCTAGCTGAAGCATA

## 2.6 临床样品的检测

用建立的方法检测的 15 份 DP 病料中,有 3 份结果呈阳性。

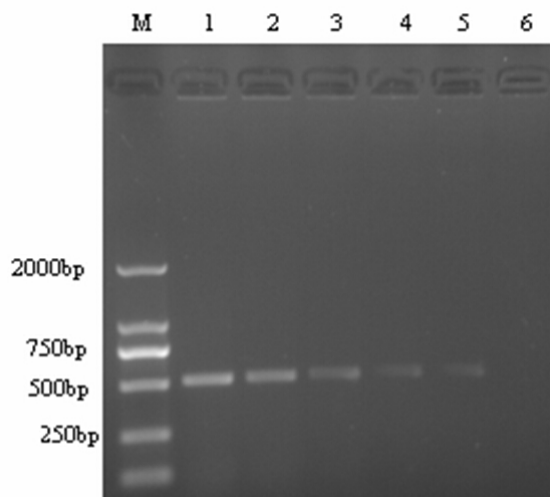


图 3 敏感性试验结果

M: DL2000 MarKer, 1: 10ng DNA, 2: 1ng DNA, 3: 100pg DNA, 4: 10pg DNA, 5: 1pg DNA, 6: 0.1pg DNA

## 3 讨论

本试验对 GenBank 公布的 DPV 基因序列进行比对,发现 DPV UL30 基因相对比较保守,查找出其高度保守区域,参照 GenBank 中登录的 DPV 基因序列(EF554403),利用 Primer Premier5.0 设计 1 对引物,通过 PCR 扩增出目的基因,连接到 pMD18-T 载体,送样测序,对测序结果与模板序列进行比对,其相似性为 100%。对退火温度优化,发现只有当退

火温度值为 47 °C 时,才能获得较为理想的产物,即使相差 2 °C 也不能获得理想的试验结果。对引物浓度进行优化,在引物浓度为 0.2~1.2 μmol/L 时不影响 PCR 反应的扩增效率,扩增效率相对较高的引物浓度为 0.6 μmol/L,扩增效率相对较低的引物浓度为 1.2 μmol/L。敏感性试验结果显示,引物的检测灵敏度可以达到 1 pg RNA。

本试验所建立的 DPV PCR 检测方法能够扩增出 510 bp 目的片段,而对常见的鸭病病毒:如鸭细小病毒、鸭圆环病毒、小鹅瘟病毒、鸭肝炎病毒、鸭 H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒和鸭副粘病毒均无扩增产物,证明本方法具有很好的特异性。

用建立的 DPV PCR 检测方法,检测 15 份鸭病料,检出 3 份 DPV 阳性病料,因此,本试验所建立的方法为 DP 的流行病学调查和检测提供一种简单、快速和有效的方法。

## 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第二版.北京:科学出版社,1997.
- [2] Plummer P J, Alefantis T, Kaplan S, et al. Detection of enteritis virus by polymerase chain reaction [J]. Avian Diseases, 1998, 42: 554-564.
- [3] 甘孟侯.中国禽病学[M].北京:中国农业出版社,1999:109-119.
- [4] 岳华,汤承,余勇,等.禽病临床诊断彩色图谱[M].成都:四川科技出版社,2002.
- [5] Baudet A E R F. Mortality in ducks in the Netherlands caused by a filtrable virus; fowl plague [J]. Tijdschr Diergeneesk, 1923, 50: 455-459.



# 一例犬髌骨双侧性内方脱位的诊断与治疗

任 婧

(广西柳州畜牧兽医学校, 广西 柳州 545003)

**摘要:** 犬髌骨内侧脱位是指髌骨从滑车槽中向内侧移位, 别名又称膝盖帽滑脱。笔者通过对一例7岁雄性英国可卡犬髌骨双侧性内方脱位病例进行手术诊治, 结果显示两后肢髌骨正常, 关节面显示完整。随访至今未见复发, 治疗效果明显。

**关键词:** 犬; 髌骨内方脱位; X线检查; 诊治

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0039-03

犬髌骨内侧脱位是指髌骨从滑车槽中移位, 别名又称膝盖帽滑脱, 常发生于小型犬。其病因不详, 主要是先天发育不足和后天局部损伤引起髌骨脱位。针对一例双侧性髌骨内方脱位病例, 在原有的诊断治疗方法指导下进行治疗, 并将手术方法加以改进, 取得明显的治疗效果。

## 1 病例介绍

2013年7月初, 一宠物主人携带其犬送到某校宠物诊疗美容中心进行诊治。主诉: 7岁英国可卡犬, 雄性, 体重10.2 kg; 患犬从小就有后肢运步异常的现象, 但不影响日常生活而未引起注意。2个月前, 该犬剧烈运动时突发后肢跛行, 左后肢能自行伸展后恢复正常, 右后肢需要人工帮助伸展后才能恢复。有时甚至右后肢悬垂不敢着地, 随来就诊。

## 2 临床检查

该犬体格状态良好, 体温38.2℃, 心率98次/min, 呼吸58次/min, 饮食、排粪尿均正常, 呼吸匀称, 心肺音正常无杂音, 肠道蠕动音正常有节律。两前肢粗壮, 毛发光亮柔顺, 眼鼻无异常分泌物。右后肢悬垂不敢着地, 左后肢运步谨慎; 拉伸右后肢患犬疼痛躲避, 左后肢无明显痛感。

## 3 X线检查

患犬仰卧腹背位X线检查, 显示患犬右后肢髌骨向内侧脱出滑车槽, 滑车槽变浅, 股骨远端和胫骨近端变形, 髌骨扁平, 变宽变形; 左后肢髌骨在滑车槽内, 但股骨远端和胫骨近端轻微变形, 髌骨也宽大变形。如图1。

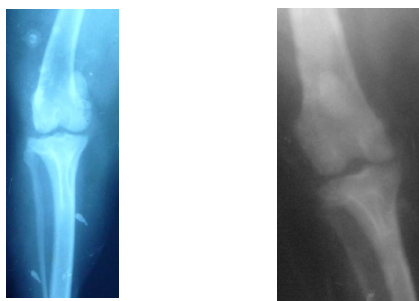


图1 术前膝部前后位X线片

A: 右膝部髌骨脱位 B: 左膝部髌骨宽大变形

## 4 脱位分类标准<sup>[1]</sup>

### 4.1 I级脱位

髌骨能够脱位, 在正常运动过程中很少发生自发性脱位。在体检过程中发生人工髌骨脱位, 但压力排除, 髌骨复位。关节屈曲和伸展正常。

### 4.2 II级脱位

股骨扭转变形轻微, 髌骨在人工外力作用或屈曲膝关节时发生脱位。只有在相反作用力和病犬反旋胫骨时才能复位。

### 4.3 III级脱位

髌骨大多数时间内侧脱位, 只有在膝关节伸展时才能人工复位。然而, 人工复位后, 随着膝关节的屈曲和伸展, 又会再度脱位。股四头肌群内侧移位。膝关节支持的软组织异常, 股骨和胫骨变形。

### 4.4 IV级脱位

胫骨近端平台有80°~90°的旋转。髌骨脱位不能人工复位。股骨滑车槽变浅或消失, 股四头

肌群内侧移位。膝关节支持的软组织异常,股骨和胫骨明显变形。

### 5 诊断与治疗

#### 5.1 诊断

根据患犬的发病病史、临床检查、X线检查、体格状态等综合诊断,患犬右后肢为髌骨内方III级脱位,左后肢为髌骨内方II级脱位。

#### 5.2 治疗

手术方法采用保留关节软骨的滑车槽加深术。由于犬只年龄较大,故采用呼吸麻醉机进行吸入式麻醉。麻醉前用安定和阿托品进行镇静与抑制腺体分泌,以加强麻醉效果。

**5.2.1 右后肢手术疗法** 犬只左侧卧保定,固定左后肢,游离右后肢。患肢手术部位剃毛消毒,用一次性无菌创巾包裹,再铺上无菌创巾,巾钳夹好固定,显露手术部位。在右后肢髌骨外侧切创,往上扩创至股骨远端1/3,往下扩创至胫骨粗隆以下。钝性分离皮下组织,切开放筋膜张肌,再钝性分离肌肉至关节,屈曲右后肢,显露滑车槽。使用骨科小钢锯在滑车槽两边缘做两个垂直切口,用骨凿小心取出滑车软骨,软骨用浸透温生理盐水的纱布包裹。再用骨锉、骨凿与咬骨钳去除部分软骨下松骨质以加深滑车槽。完成后将取下的滑车软骨覆盖在加深了的滑车槽中,如图2。

**5.2.2 左后肢手术疗法** 右后肢手术治疗3个月后,宠物主人带犬只到医院检查身体,主述患犬右后肢恢复状态好,已经能自主负重。同时,左后肢进行食疗与限制运动的保守疗法治疗。左后肢保守疗法初见成效,病情没有进一步发展,故选择暂时不进行外科手术治疗。但2个月后,左后肢病情突然恶化,经检查判断,髌骨内方脱位由II级脱位发展为III级脱位,必须进行外科手术治疗。

手术治疗过程与右后肢相似,保留关节软骨,加深滑车槽,打磨变形的髌骨。关节面手术完成后,常规缝合韧带层和肌肉层。由于该犬左后肢髌骨重复性脱位且拖延时间长,髌骨韧带松弛,为防止复发,要将其髌骨韧带加紧固定。使用骨钻隔着肌肉层在靠近胫骨粗隆处的韧带上打两个平行穿透的孔,两孔间隔大约1.5cm,使用灭菌尼龙线(不可吸收)互相穿透两个孔,并固定在肌肉上,收缩绑紧。完成后常规闭合手术部位。术后护理与右后肢手术相同。

进行左后肢手术时,右后肢已施行手术5个月,恢复时间长,已经恢复正常生理功能。但由于

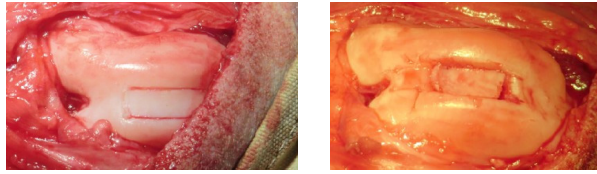


图2 滑车槽加深术

A: 滑车槽垂直切口 B: 软骨覆盖在加深的滑车槽中

左后肢病情加重,身体后部全部压力集中在右后肢,导致手术后未彻底康复的右后肢负重增加,不利于关节的全面恢复。左后肢施行手术1个月后随访,宠物主人表示犬只恢复状态好,已经完全康复,可以奔跑跳跃。患犬运动功能恢复良好,且肢体形状改善,运步时不会显得异常。进行X线检查,结果显示两后肢髌骨正常,关节面显示完整(如图3)。至今未发现有复发现象。

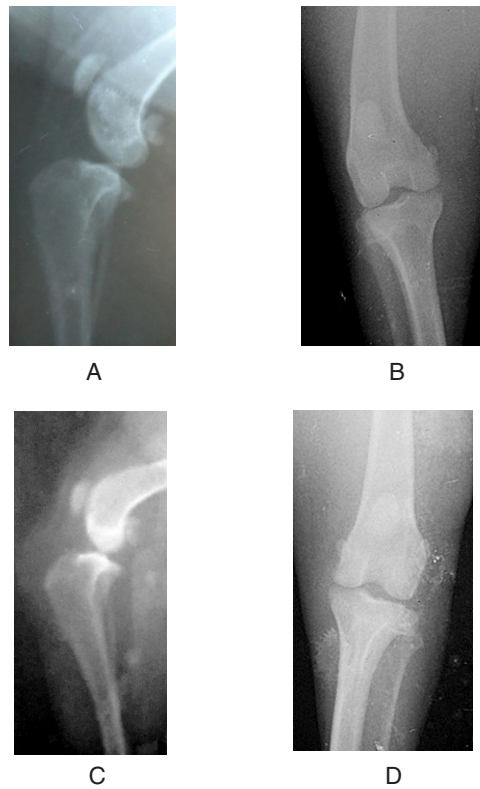


图3 术后膝部X线片

A: 右膝部侧位; B: 右膝部前后位; C: 左膝部侧位; D: 左膝部前后位

### 6 小结与讨论

**6.1 本病例为小型犬先天性双侧性髌骨内方脱位,右后肢属于III级脱位,左后肢由于病程变化,由II级脱位发展为III级脱位。治疗时综合考虑患**

犬实际情况与畜主的需求,在原有的成熟的诊断治疗方法指导下将滑车槽加深术和滑车切除术进行改进,以适应病情与控制术后并发症的发生。手术后,两后肢髌骨正常,关节面X线显示完整。手术后随访至今未发现复发现象,本手术治疗效果确切有效。

**6.2** 髌骨脱位是犬的一种先天性缺陷疾病,幼犬发生髌骨脱位的几率为7.2%,为所有先天性缺陷疾病中比率最高的。根据髌骨的位置可分为内侧性和外侧性脱位两种。内侧髌骨脱位多发生于小品种的犬;外侧脱位在大型犬的发病比例较高。以髌骨内方脱位为多见,占75%~80%<sup>[2]</sup>。

**6.3** 犬髌骨脱位的病因一直不清。主要是先天发育不足和后天局部损伤。髌骨内方脱位常为先天性的,多发生于幼年期。髌骨外方脱位(又称膝外翻)多与外伤、髌关节发育异常有关,多见于大型品种犬<sup>[3]</sup>。最普遍的理论认为髌骨脱位起始于髌骨内翻以及股骨头和股骨颈前倾角的减少,由此导致后肢伸肌(主要是股四头肌群)向内侧移位。这种肌肉的移位后果是股骨远端和胫骨近端出现弓形弯曲和旋转。进一步的影响就是这种长期的慢性脱位使髌骨不能在滑车上产生足够的压力,从而导致生长期的动物形成不了足够宽度和深度的滑车槽。另一种理论是基于实验观察的结果,指出在雌二醇、苯甲酸盐的作用下,滑车槽会变浅,而导致髌骨容易脱位<sup>[4]</sup>。

**6.4** 髌骨内方脱位可以采用保守治疗或手术治疗。对治疗方法的选择依赖于临床状态、病史、生理检查、病犬的机体状态如年龄等。一般认为,使用手术来治疗髌骨内方脱位是可以获得良好的效

果的。但是对无明显症状的I、II级脱位进行手术治疗,目前还存在争议。研究指出,外科手术有可能会造成进行性关节炎及退行性关节病变,且随着术后经历时间延长而日趋严重。因此,有些学者主张待临床症状出现II、III、IV级时,才施行外科治疗,而I级脱位则不予处理,以减少因外科手术产生的关节病变<sup>[5]</sup>。

**6.5** 有报道采用滑车峭垫高术和滑车峭加高术来治疗内侧髌骨脱位。滑车峭增高术是将患侧滑车峭自基部切下,将2mm厚的硅胶片修剪成滑车峭切面的形状,置于滑车峭切面上,再将滑车峭覆于胶片上,用骨螺丝钉固定;滑车峭加高术是在患侧滑车峭的近心端和中点打孔,然后将一直径为2mm的拱形不锈钢丝镶嵌在患侧的滑车峭背面,以此来阻挡髌骨的再次脱位<sup>[8]</sup>。但此种手术方法属于初步尝试,技术尚未成熟,疗效的确切程度还有待进一步验证,且手术过程采用价格较高的材料,在临床病例的应用中会受到手术费用的限制。

## 参考文献:

- [1] Theresa W F, Cheryl SH, Donald AH, et al. 小动物外科学[M]. 第二版. 张海彬, 夏兆飞, 林德贵, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 1094-1098.
- [2] 刘云, 郑家三. 犬髌骨脱位[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(6): 64-65.
- [3] 李玲, 于志海. 手术治疗犬髌骨外方脱位[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(3): 62.
- [4] 牛光斌, 罗莎, 丛横飞, 等. 正常小型犬的髌骨垂直位置研究[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(4): 57-58.
- [5] 冯万宇, 刘云, 王洪斌. 一例犬双侧性髌骨脱白的诊治报告[J]. 现代畜牧兽医, 2004(11): 33-34.

(上接第32页)

中,应考虑以当前流行毒株研发新的疫苗毒株,或从转型升级生产管理,提高生物安全水平等方面着手,才能达到对该病的有效防控。

(致谢:部分参考毒株及疫苗毒株序列由中国动物卫生与流行病学中心刘翔博士提供。)

## 参考文献:

- [1] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I: 鸡 A 型禽流感病毒的分离及血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 20(10): 3-5.
- [2] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal Primer set for full-length amplification of all influenza A

Viruse[J]. Arch Virol, 2001, 146: 2275-2289.

- [3] Jiang Wenming, Liu Shuo, Hou Guangyu, et al. Chinese and Global Distribution of H<sub>9</sub> subtype Avian influenza Viruses[J]. Plosone, 2012, 7(12): e 52671.
- [4] Matrosovich M N, Krauss S, Webster R G, et al. H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> Influenza A Viruses From Poultry in Asia have Human Virus-like Receptor Specificity [J]. Virology, 2001, 281(2): 156-162.
- [5] 刘彦云, 刘春国, 王寿山, 等. 10株H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>亚型禽流感病毒血凝素基因的序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(8): 13-19.
- [6] 陈陆, 刘守川, 赵军, 等. 不同H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>亚型禽流感病毒分离株致病力研究及HA抗原性变异分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(24): 5100-5107.

# 一例犬类固醇反应型脑炎-动脉炎的临床病例报告

李晋飞, 薛 剑, 焦 淼, 袁小兵, 邓婵娟\*

(深圳市瑞鹏宠物医院有限公司, 广东 深圳 518000)

**摘 要:** 本文报告 1 例罗威纳犬类固醇反应型脑炎——动脉炎 (Steroid-responsive meningitis-arteritis) (SRMA) 病例, 阐述该病例的特点、临床表现、实验室诊断、鉴别诊断及其治疗。

**关键词:** 犬; SRMA; 抽搐; 脑脊液; 检测

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0042-03

小动物临床工作中, 我们经常会遇到感染性或非感染性因素导致的中枢神经系统 (CNS) 炎症, 其病因包括病毒性、细菌性、真菌性、特发性、免疫介导性、肿瘤、大脑或脊髓外伤性、缺血性等。中枢神经系统炎症的特点是外周血白细胞对神经质和被膜的浸润, 改变血管的完整性而导致水肿。中枢神经系统炎症的疾病诊断较困难, 许多此类疾病的诊断数据并无特异性。脑脊液 (CSF) 实验室诊断是一种评价大脑和脊髓功能最好的诊断依据之一。当动物出现特定的或疑似神经性疾病, 但又难以诊断时, 可以选择进行脑脊液的检测<sup>[1]</sup>。如: 犬猫出现癫痫、疑似颅内疾病、高烧、轴性疼痛等。但脑脊液的采集有一定的风险, 选择要慎重。

类固醇反应型脑炎——动脉炎 (Steroid-responsive meningitis-arteritis, SRMA) 属于免疫学疾病, 患病动物临床症状频繁发生。该疾病的组织病理学特点为脑膜的炎性细胞浸润和脑膜动脉的炎性狭窄性病变<sup>[1]</sup>。大量的 IgA 的产生在疾病的发展过程中起了重要的作用。SRMA 有两种临床表现形式: 大多数为典型的急性型, 另外一种就是非典型 (慢性型)。急性型表现为: 发烧, 疼痛, 颈强直, 脑脊液中中性粒细胞增多。慢性非典型主要表现为: 神经功能障碍, 复合或单核细胞增多。本病治疗多采用糖皮质激素来抑制细胞因子、前列腺素和白三烯的产生, 抑制炎性细胞进入血脑屏障, 从而降低组织的损伤。多选用长期

服用泼尼松龙。

## 1 病例介绍

罗威纳犬, 6 岁, 公, 未绝育, 疫苗免疫记录良好。2013 年 12 月出现多次全身抽搐, 颈部强直, 给予头孢曲松、泼尼松、苯妥英钠治疗, 3 d 后症状消失, 观察 2 d 未出现抽搐后, 办理出院, 停止药物治疗。2014 年 2 月 19 日, 该犬症状再次出现, 每 1~2 h 全身抽搐一次, 颈部强直, 体温 41.3 °C, 再次来我院就诊。临床检查发现, 该患犬未抽搐时触诊仍有疼痛感, 且颈部疼痛感较其他部位敏感, 伴颈部活动受限, 不愿低头, 其他未见明显异常。

## 2 实验室检查

### 2.1 脑脊液检测

经延髓池采集脑脊液送检, 结果见表 1。脑脊液中存在大量的 IgA, 该结果由德国纳博科临实验室检测。

### 2.2 血常规检测

血常规检查结果显示, 该患犬白细胞升高, 提示该患犬处于感染状态 (见表 2)。

### 2.3 血清生化检测

血清生化结果显示, CK (肌酸激酶) 升高, 其他生化指标未见明显异常 (见表 3)。

## 3 初步诊断

综合各项化验结果, 初步诊断为类固醇反应型脑炎 - 动脉炎 (SRMA)。

收稿日期: 2014-10-27

\*: 通讯作者

表 1 脑脊液穿刺检测结果

检测项目	检测值	参考值	备注
总蛋白	0.13 g/L	<0.25-0.30 g/L	
IgA (免疫球蛋白 A)	21.4 mg/dl	<0.1 mg/dl	ELISA 方法检测
CRP(C 反应蛋白)	0.3 mg/L	<5 mg/L	
FSME IgG-AK(弗-斯二氏脑膜脑炎)	12.85 U/mL	<63 U/mL	ELISA 方法检测
犬瘟热病毒	阴性		PCR 方法检测
犬新孢子虫	阴性		PCR 方法检测
弓形虫	阴性		PCR 方法检测
嗜吞噬细胞无形体	阴性		PCR 方法检测

表 2 血常规检测结果

项目	检测结果
WBC(白细胞计数)	+19.7×10 <sup>9</sup> /L
RBC(红细胞计数)	7.45×10 <sup>12</sup> /L
HGB(血红蛋白)	15.6g/dL
HCT(红细胞压积)	0.473
MCV(平均红细胞体积)	-63.5 fL
MCH(平均红细胞血红蛋白含量)	20.9pg
MCHC(平均红细胞血红蛋白浓度)	33.0g/dL
PLT(血小板计数)	365 ×10 <sup>9</sup> /L
LYM%(淋巴细胞百分比)	14.7%
OTHR%(其他细胞百分比)	81.6%
EO%(嗜酸性粒细胞百分比)	3.7%
LYM#(淋巴细胞绝对值)	2.89×10 <sup>9</sup> /L
OTHR#(其他细胞绝对值)	+16.07×10 <sup>9</sup> /L
EO#(嗜酸性粒细胞绝对值)	0.73×10 <sup>9</sup> /L

表 3 血清生化检测结果

检测项目	检测结果	参考值
GLU(血糖)	5.76 mmol/L	4.11-7.59
BUN(尿素氮)	4.7 mmol/L	2.5-9.6
CREA(肌酐)	111 umol /L	44-159
BUN/UREA(尿蛋白肌酐比)	10	
PHOS(磷)	1.54 mmol/L	0.81-2.20
Ca(钙离子)	2.46 mmol/L	1.98-3.00
CK(肌酸激酶)	+356U/L	10-200
TP(总蛋白)	73 g/L	52-82
ALB(白蛋白)	35 g/L	23-40
GLOB(球蛋白)	38g/L	25-45
ALT(丙氨酸转氨酶)	77U/L	10-100
ALB/GLOB(白球比)	0.9	
ALKP(碱性磷酸酶)	103U/L	23-212
GGT(谷氨酰转肽酶)	<0U/L	0-7
TBIL(总胆红素)	5 umol /L	0-15
CHOL(胆固醇)	4.04mmol/L	0-15
AMYL(胰淀粉酶)	934U/L	500-1500
LIPA(脂肪酶)	683U/L	200-1800

## 4 治疗

泼尼松 2.5 mg/kg 皮下注射, 静脉注射地西洋, 另外, 由于病犬食欲不佳, 还配合输液支持疗法。3 d 后症状逐渐消失, 改为口服泼尼松 4 mg/kg, 并服用癸安舒片, 巩固 3 d 后出院。出院后, 泼尼松 2 mg/kg 继续服用 3 w, 随访未发现症状出现, 体温正常, 精神食欲佳。后给予 0.2 mg/kg 长期服用, 未见复发。

## 5 讨论

炎症性疾病在中枢神经系统疾病中占有很重要的比重, 犬类神经学疾病中约有 10% 的病例是

由于炎症或感染, 约有 15% 是由于 SRMA 所致<sup>[2]</sup>。SRMA 常发品种为比格、伯恩山犬、斗牛犬、德国短毛猎犬, 偶然发生于其他品种, 且多见于 8-18 月龄的年轻犬。

在该病例中, 血常规的异常仅见于显著的白细胞增多。许多中枢神经系统炎症的早期不会产生系统性的反应, 即白细胞并不出现增高的现象, 但阳性的结果依然是有参考价值的。SRMA 是一种神经学的疾病, 大多数感染的动物会出现白细胞增多。血液生化的结果则用来排除出现相同临床症状的其他可能的因素。该病例中 CK 的显著升

高,相关疾病有:坏死性血管炎、结节性多动脉炎、犬疼痛综合症、大动脉炎综合症、中枢神经系统性血管炎、神经外病变等,这也是本病例的诊断依据之一。脑脊液 C 反应蛋白检测被认为是一个重要的炎症参数,在脑脊液中的浓度水平应该低于检出极限值。在 SRMA 病例,脑脊液中 IgA 浓度明显升高。该物质水平在中枢神经系统炎症或感染疾病中的鉴别诊断过程中起着重要的作用。因此,SRMA 疾病在临床中的诊断是综合临床症状,实验室检测,脑脊液检测结果而得出的。

急性期的年轻犬若得到积极的治疗预后相对较好。在慢性病例中,症状频繁发生,预后需慎重,而且治疗复杂,疗程较长。大约有 60%的患 SRMA 疾病的犬应用免疫抑制治疗后预后良好,大概有 5%犬的病例治疗失败。

患 SRMA 的犬需要长期的皮质固醇治疗。首次

泼尼松剂量为 4 mg/kg,2 d 后剂量降到 2 mg/kg;持续 2 w 后,按照 1 mg/kg 使用 1 m;如未见异常症状,按 0.5 mg/kg 维持 1 m,尔后,0.5 mg/kg,2d 1 次,持续 1 m<sup>[3]</sup>。

**参考文献:**

[1] Di Terlizzi R,Platt S:The function,composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I- Function and composition[J].Vet J,2006(172): 422-431.

[2] Radaelli S T,Platt S R:Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs:A retrospective study of 23 cases (1990-1999) [J].J Vet Intern Med,2002(16):159-163.

[3] Gandini G,Brini E,Bellotti D, et al:Clinical and clinic pathologic findings in three dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis(SRMA) [J].Vet Res Comm,2003(27 Suppl1):763-1765.

《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

订 价:每期定价 5.5 元,全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式:本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

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

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

# 自发性 Beagle 犬前列腺增生模型的建立

胡敏华, 龙海斌, 倪庆纯, 刘运忠\*

(广州医药研究总院有限公司 国家犬类实验动物种子中心, 广东 广州 510240)

**摘要:** 到目前为止, 研究证实能够随年龄增长自发形成前列腺增生的动物只有犬科动物以及包括人在内的灵长类动物。而 Beagle 犬是国际公认的实验用犬, 因此, Beagle 犬是研究自发性前列腺增生的极好模型。本文采用 SIUI Apogee 3100V 兽用全数字彩色多普勒超声诊断仪对 Beagle 犬前列腺大小进行测定, 结果证实不同年龄段 Beagle 犬前列腺体积差异显著, 且其体积随着年龄的增大而增加, 为自发性前列腺增生模型提供基础数据。

**关键词:** Beagle 犬; 多普勒超声诊断仪; 自发性前列腺增生

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0045-02

Beagle 犬品种固定且优良, 遗传性疾病少, 遗传性能稳定, 在研究工作中能够得到重复性好而稳定的结果, 对环境的适应力、抗病力较强, 被公认为理想的实验动物, 广泛应用于医药研究等生物学领域。良性前列腺增生(Benign Prostatic Hyperplasia, BPH) 是老年男子常见疾病, 但 BPH 的病因学和病理生理机制至今尚未完全阐明。而犬类及灵长类动物与人的前列腺最为相近, 均随年龄的增长而增大。作者观察了不同年龄段犬前列腺体积大小, 并提出了自发性 BPH 模型的参考标准, 旨在为 BPH 的研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与饲养管理

广州医药研究总院有限公司实验动物基地(国家犬类实验动物种子中心)的1岁以上雄性 Beagle 犬 83 只, 生产许可证号 SCXK (粤)(2013-0007)。根据不同年龄段分为 6 组: 1-1.5 岁(含)、1.5-2.5 岁(含)、2.5-4 岁(含)、4-6.0 岁(含)及 6 岁以上。单笼饲养, 每天上下午各饲喂 1 次, 自由饮水。体重为 10~15 kg。

### 1.2 实验方法

用 SIUI Apogee 3100V 兽用全数字彩色多普勒超声诊断系统对不同年龄段 Beagle 犬前列腺进行测定。仔细扫查显示前列腺横断面及纵断面声像

图后, 全部进行图像冻结固定并摄片。分别用电子尺测量前列腺的最大横径(即左右径), 纵径(即上下径)及厚径(前后径), 然后, 根据公式  $V = \pi / 6 \times \text{前后径} \times \text{左右径} \times \text{上下径}$ , 计算出前列腺体积的近似值( $\text{cm}^3$ )<sup>[1]</sup>。所有操作均由同一人完成。

### 1.3 数据分析

全部数据采用 SPSS20.0 进行统计分析, 差异显著性采用 LSD 多重比较法进行单因素方差分析。数据用平均数±标准误表示。

## 2 结果

鉴于 B 超探测前列腺体积与排水法测量实际体积有密切的相关性( $r=0.920$ ), 通过 B 超探测可以直接估算犬前列腺大小<sup>[2]</sup>。如图 1 所示, 利用 SIUI Apogee 3100V 兽用全数字彩色多普勒超声诊断系统对前列腺进行测定, 可获得清晰前列腺图像。由表 1 可知, Beagle 犬前列腺体积大小随年龄的增长而增大。根据相关数据库分析得出, 雄性 Beagle 犬大约于 1.5 岁时为适宜初始配种年龄, 其前列腺体积相对较小, 极显著小于其它年龄段 Beagle 犬 ( $P < 0.01$ )。而 1.5 岁到 6 岁为 Beagle 犬适宜配种年龄段, 其前列腺大小显著高于 1.5 岁 ( $P < 0.05$ )。雄犬到 6 岁后, 前列腺体积极显著大于 6 岁前 ( $P < 0.01$ ), 从而间接表明此年龄的犬已不适宜种用。

收稿日期: 2014-10-20

\*: 通讯作者

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAK11B00); 广州市科研条件建设项目(穗科信字[2011]233-16)。

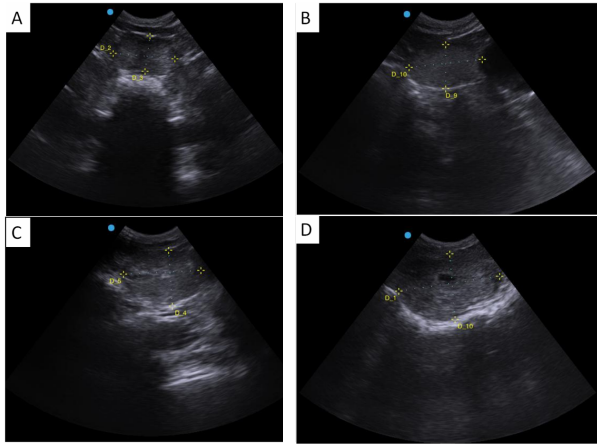


图 1 彩超测定 Beagle 犬前列腺大小

A: 前列腺横断面声像图; B: 前列腺纵断面声像图;  
C: 正常前列腺大小声像图; D: 前列腺肥大声像图

表 1 不同年龄段 Beagle 犬前列腺体积大小

年龄段(岁)	样本数	体积( $\text{cm}^3$ )
1-1.5(含)	9	9.72 $\pm$ 1.34 <sup>ab</sup>
1.5-2.5(含)	19	17.77 $\pm$ 1.32 <sup>ab</sup>
2.5-4(含)	10	17.98 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup>
4-6(含)	28	21.26 $\pm$ 1.53 <sup>b</sup>
6 以上	17	27.84 $\pm$ 3.00 <sup>c</sup>

注:数据右上方有不同小写字母表示差异显著( $0.01 < P < 0.05$ );不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

BPH 是一种多发于中老年男性的常见病和多发病,发病率随年龄增长而增加,病情也逐年加重。随着人们生活水平的提高,人类寿命得到一定的延长,加上计划生育政策,我国人口老龄化日益突显,罹患 BPH 的绝对人数明显增多<sup>[3,4]</sup>。对于传统的手术治疗 BPH,避免不了创伤及破坏,容易引发术后并发症,因此相对安全方便的药物治疗成为 BPH 患者的首选。为了评价治疗 BPH 药物,BPH 动物模型的制备显得尤为重要。在自然界中只发现人、犬及一些灵长类动物存在自发性 BPH 现象,且发病机制类似<sup>[5-7]</sup>。犬通常用于进行有关 BPH 方面的研究。虽然 Steiner 等指出,黑猩猩的前列腺在解剖与生理上均接近人类,可能取代犬作为研究人类 BPH 的最佳动物模型。但事实上,黑猩猩非常稀有和珍贵,现实中应用其作为动物模型有一定的难度,因此,利

用犬作为 BPH 模型研究最为合适。在制备犬 BPH 模型中,分为自发性 BPH 模型及现时大多数学者采用的去势后注射激素诱导方法<sup>[8-10]</sup>。相比而言,自发性 BPH 模型要比去势诱导 BPH 模型更接近 BPH 的发病及病理机制。前列腺体积测量有 B 超法及麻醉后实际测量法,据文献报道,两法所得前列腺体积基本一致,B 超法测得数据与实际大小具有高度相关性<sup>[2,11]</sup>。本研究中,BPH 老年犬的筛选标准为犬龄在 5 岁以上且 B 超探测前列腺体积大于  $18 \text{ cm}^3$ <sup>[10]</sup>。本文表明 6 岁以上、前列腺体积大于  $18 \text{ cm}^3$  的 Beagle 犬可作为 BPH 的研究模型。对本次测定所有 Beagle 犬中,超过半数有自发性 BPH 现象。

### 参考文献:

- [1] Terris M K, Stamey T A. Determination of prostate volume by transrectal ultrasound[J]. J Urol, 1991, 145(5): 984-987.
- [2] 吴建辉, 孙祖越, 彭许梅, 等. 犬前列腺体积与重量的关系及腹壁超声测量法的应用[J]. 上海实验动物科学, 2003(4): 218-220.
- [3] Liao L M, Schaefer W. Cross-sectional and longitudinal studies on interaction between bladder compliance and outflow obstruction in men with benign prostatic hyperplasia[J]. Asian J Androl, 2007, 9(1): 51-56.
- [4] Xia S J, Xu X X, Teng J B, et al. Characteristic pattern of human prostatic growth with age[J]. Asian J Androl, 2002, 4(4): 269-271.
- [5] Steiner M S, Couch R C, Raghov S, et al. The chimpanzee as a model of human benign prostatic hyperplasia [J]. J Urol, 1999, 162(4): 1454-1461.
- [6] Mubiru J N, Hubbard G B, Dick E J, et al. Nonhuman primates as models for studies of prostate specific antigen and prostatic diseases [J]. Prostate, 2008, 68(14): 1546-1554.
- [7] 秦志杰, 林毓琴, 罗道春, 等. 性激素及人前列腺生长因子对人前列腺间质成纤维细胞增殖的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1996(4): 35-38.
- [8] 陈晖, 刘修恒, 金化民. 雌雄激素联用制作犬前列腺增生动物模型[J]. 临床泌尿外科杂志, 2005(1): 44-46.
- [9] 吴建辉, 孙祖越, 朱焰, 等. 去势 Beagle 犬前列腺增生模型的建立[J]. 中华男科学, 2003(6): 425-428.
- [10] 吴建辉, 徐斯翀, 潘琦, 等. 自发性及睾酮诱导犬前列腺增生模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2013(3): 21-26.
- [11] 蔡瑞芬, 崔毓桂, 华立新, 等. 老年犬自发性前列腺增生的实验研究[J]. 中华男科学, 2003, 9(9): 651-653, 657.



# 湘村黑猪选育中的疫病防控措施

胡百文<sup>1,2</sup>, 刘建<sup>1,2</sup>, 杨文莲<sup>2</sup>, 龚朝霞<sup>2</sup>, 邓近平<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 湘村高科农业股份有限公司, 湖南娄底 417000)

**摘要:** 湘村黑猪选育是继代选育, 每一个世代都不能出问题, 否则选育将会中断。为使湘村黑猪安全育成, 在综合防治、饲养管理以及保健等措施上做了大量工作, 为育种工作进行和育种任务圆满完成提供了可靠保障。本文就湘村黑猪选育过程中疫病防控的方法与措施, 进行了一些总结, 供养猪同行参考。

**关键词:** 湘村黑猪; 疫病防控; 措施

**中图分类号:** S851.33

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2014)06-0047-03

随着养猪业从小型、分散向集约化、规模化养殖方式的转变, 疫情的发生机会、疫病的复杂程度、病情的严重程度大也随之上升。虽然猪的饲养管理及疫病防治技术取得了长足进步, 但仍有一些疾病至今尚无有效的防治办法, 给养猪业带来重大的经济损失。

湘村黑猪是以桃源黑猪为母本、杜洛克猪为父本, 通过杂交合成、横交固定和6个世代继代选育而成, 为国家级新品种。湘村黑猪是国内外生猪品种资源优势的集大成者, 具有产仔率高, 肌内脂肪含量高、瘦肉率高、生长快和肉质口感极佳等独特性状。其加工制品更是酥透滑嫩、香脆味美、深受市场青睐。

## 1 疫病防控原则

疫病防控应贯彻“预防为主、养防结合、防重于治”的原则。防止猪病的发生, 以求育成健康的猪群。因此“养”是基础, “防”是生命线。本课题组在疫病防治上采取两手抓: 一手抓防疫操作规程和免疫程序的落实; 一手抓《员工岗位职责与操作规程》的实施, 以求实现科学的、规范化的饲养管理。同时, 加大对防疫的投入, 使防疫设备基本完善。课题组认真抓了三个方面的工作: 一是抓“防”, 就是根据猪群状况及周边疫情情况制定防疫操作规程及合理的免疫程序; 二是抓“保”, 就是做好猪群的保健工作, 对猪群实施科学的、规范化

的饲养管理, 为猪群创造舒适的环境。三是抓“控”, 就是发生疫情, 不管大小, 迅速采取针对性措施, 控制其蔓延。

## 2 疫病防控措施

育种场制定了防疫操作规程及免疫程序, 并随时根据周边地区和自身疫情以及猪群抗体监测情况, 及时调整免疫范围和防疫措施。

### 2.1 综合防疫设施

场内实行区域性布局, 办公生活区、育种区、繁育生产区严格分离。场内设消毒室、消毒池; 每栋舍有消毒池。完善下水道、粪尿、污物、病猪隔离和无害化处理等配套建设。育种、繁育生产区的配套防疫设备、设施均严格分开。

### 2.2 经常性消毒制度

进场车辆严格消毒。有关人员要进入生产区, 需经消毒室消毒, 更衣、换鞋后方可进入。栏舍在出猪后和进猪前, 要严格清洗, 经酸性和碱性消毒液交替消毒后方可进猪。配种前、分娩前后, 均用高锰酸钾对生殖器、腹部及乳房进行消毒。诊治病猪、阉割、防疫时所用器械和伤口严格消毒。每周定期对猪舍四周、栏舍、用具、猪体消毒1次。

### 2.3 兽医卫生制度

区域内, 兽医每天巡视栏舍2次, 发现问题及时处理。育种、繁育生产实行管理人员、兽医、饲养员严格分开。生产区内谢绝参观。定期驱虫。

收稿日期: 2014-09-30

\*: 通讯作者

基金项目: 国家发改委生物育种高新技术产业化专项[发改办高科技(2007)2490号]

注意抓好以下 5 项卫生工作:①饲料、饮水卫生。饮水洁净,饲料不发霉、不变质、不含其他异物。②用具卫生。猪用食槽、水槽经常清洗。饲养员用的铁锹、扫帚、料车等工具保持清洁卫生。③猪舍卫生。猪舍地面、过道保持清洁干燥,舍内通风良好,空气新鲜。④环境卫生。猪舍四周栽树、种菜、无粪便及杂物,运动场保持清洁。⑤做好灭蚊、灭鼠工作。

## 2.4 免疫接种

制订科学的程序,实施 100%免疫密度。制订的免疫程序如表 1。

选择质量好、安全可靠的疫苗。必须按要求运送疫苗与保存疫苗,以免疫苗失效而使免疫失败。遵守操作规程,注射器、针头、镊子以及注射部位均消毒,做到一猪一针头,一苗一注射,杜绝打飞针。做好免疫记录。详细记载注射日期、疫苗种类、生产厂家、批号、注射剂量、群别、饲养员姓名。定期对猪群抗体状况进行监测。

## 3 保健措施

### 3.1 改善环境

增设水帘降温 and 沼气取暖设施,基本实现冬

暖夏凉。注意猪舍的通风换气,保持舍内空气新鲜。栏舍以清扫为主,少用水冲洗,保持栏舍干燥。粪便及时送到化粪池,经沼气发酵处理。减少因过冷、过热、以及人为因素给猪只带来应激反映。

### 3.2 保证饲料质量

保持饲料的相对稳定。从原料采购、加工、配方、保管,都有专人负责管理。分阶段饲喂不同标准的饲料。严禁饲喂霉变饲料。

### 3.3 改进饲喂方法

乳猪和小猪自由采食,但小猪常因采食过多致消化不良而下痢。因此,采用少食多餐,少放勤添的办法投料。后备猪和母猪限量饲喂,防止采食过量,使母猪过肥,引起繁殖障碍、乳腺炎、仔猪下痢等疾病。

### 3.4 抓关键管理

**3.4.1 公猪管理** 公猪注意体质健康,育种体况不肥不瘦,给予充足营养的全价日粮,加强运动,定期检查公猪精液。

**3.4.2 母猪管理** ①母猪怀孕期:抓保胎,减少刺激,防止流产,保持营养。②母猪分娩期:产前、产后及时减料;母猪转入产床时消毒;临产前有人

表 1 湘村黑猪免疫程序

疫苗品名	接种对象	首免		二免	
		接种时间	剂量(头剂)	接种时间	剂量(头剂)
猪瘟活疫苗(细胞源)	仔猪	21 日龄	1	55-60 日龄	2
	母猪	配种前 10 天	2		
	公猪	1 次/6 个月	2		
猪伪狂犬病活疫苗	仔猪	28-35 日龄	0.5	49-77 日龄	1
	母猪	产前 21-28 天	2	哺乳期	2
	公猪	1 次/6 个月	2		
猪细小病毒病灭活疫苗	后备公、母猪	配种前 1-2 个月	1		
猪乙型脑炎活疫苗	后备公、母猪	150 日龄以后	1	间隔 3-4 周	1
	公、母猪	每年 4 月初	1		
猪支原体肺炎灭活疫苗	仔猪	7-14 日龄	0.5	22-36 日龄	0.5
	母猪	产前 35 天	1		
高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗	仔猪	14 日龄	1	56 日龄	1
	母猪	产前 25-40 天	2		
	公猪	2 次/年	1		
猪口蹄疫 O 型灭活疫苗	仔猪	70-84 日龄	1	间隔 2-4 周	1
	母猪	配种前 21 天	1		
	公猪	1 次/6 个月	1		

值班;分娩时阴户、腹部、乳房消毒;加强护理,发生难产时做好接生;防治乳房炎、产褥疾病。新生仔猪及时哺喂初乳,剪牙,口服痢畏 3~5 滴或庆大霉素 1~2 mL。③母猪哺乳期:抓好母猪补料;加强仔猪护理,固定乳头;注意仔猪保暖,防止仔猪下痢。产后 3 天仔猪深部肌肉注射补铁制剂牲血素 1 mL,注射长效土霉素 0.5 mL,注射亚硒酸钠-维生素 E 1 mL。产后第 7 天仔猪开始诱食。产后第 7 天再次给仔猪补铁 1.5 mL。

**3.4.3 仔猪管理** 及时断奶:采取仔猪 21 日龄同窝一次性断奶。减少断奶应激:合理分群,原则上同窝同圈;不突然变更饲料,逐渐过渡;减少人为应激反应。加强护理:注意保温与通风换气,预防感冒;栏舍保持干燥;断奶 10 天以内少喂多餐,

日喂 6~8 餐,每餐 7~8 成饱,少放勤添,确保饲料新鲜;根据需要,在饮水或饲料中添加药物;做好驱虫和其它饲养管理工作。

**3.4.4 后备猪管理** 合理分群,按日龄、体重相近、大小强弱一致进行分群。严格观察,发现病猪及时诊治,做好防疫和驱虫工作,保证后备猪健康发育。

## 4 疫情控制

若发现病猪,及时隔离、消毒。临床诊断与实验室诊断相结合,通过药敏试验制定防治措施。及时对病畜进行治疗,必要时对猪群实施药物保健。在确定病原、病因的基础上,采取综合防治措施,控制疫病蔓延。

·信息·

## 羊草全基因组测序计划全面启动

近日,由中国农业科学院草原研究所牵头,联合中国农业科学院深圳农业基因组研究所等单位共同合作的羊草全基因组测序计划已全面启动。该计划完成后,将对我国极为丰富的羊草资源的新品种选育、人工草地建植、天然草原生产力提高以及产业开发等工作带来重要推动作用。

羊草(*Leymus chinensis*(Trin.) Tzvel.)是禾本科赖草属多年生根茎型草本植物,广幅旱生草原的建群种、盐生草甸的优势种,是一种重要的优良牧草。羊草主要分布于欧亚大陆温带草原地区,在我国境内的分布约占总分布面积的 50%。羊草作为温带草原和草甸群落的关键建群种,在维持中国北方草原生态系统稳定、生物多样性、草地生产力等方面扮演重要角色。同时,作为优质牧草,在推动我国草地畜牧业健康发展上起着重要作用。

据此项测序计划的主要推动者之一、中国农业科学院草原研究所侯向阳所长介绍,羊草的基因组来源、系统发育关系与地位、物种起源至今缺乏有力证据;与草原退化相关的羊草结实率低、发芽率低、繁殖率低等“三低”问题、生态可塑性、放牧退化等问题长期困扰其合理开发与利用,而从全基因组序列中提取的生物学信息可为解决以上诸多问题提供有力证据。同时,通过羊草全基因组测序后,其蕴含的海量生态功能信息将极大地促进牧草基因组和草原生态基因组学的发展。

中国农业科学院深圳农业基因组研究所黄三文研究员介绍,羊草是高度杂合及多倍化的草本植物,我们将以新一代测序技术为基础设计羊草全基因组测序方案,完成其全基因组测序、组装和注释等,并以此为核心开展一系列基因组水平上的探索和研究。

中国农业科学院副院长吴孔明院士指出,羊草全基因组测序开辟了一条从微观领域研究大草原的新思路,对于解决草原退化与草地畜牧业等问题具有特殊的意义。同时他指出赖草属是小麦族多年生植物中用于小麦远缘杂交育种最有利用价值的一个属,从赖草属中向小麦转移耐盐、抗病基因是小麦育种家的主要目的。羊草是小麦及其他禾本科牧草的近缘种,基因组存在广泛的共线性或同线性及微共线性,在进化过程中呈现高度保守性;通过全基因组序列分析得到一些优良性状基因将成为麦类作物和牧草遗传改良的重要基因资源。

该计划将填补草原植物基因组研究的空白,有力推动草原生态系统、生物多样性、草地改良、草地畜牧业等的健康发展。同时,该计划的完成还将为世界牧草基因组、生态基因组及复杂基因组等研究提供全新的起点和平台。(信息来源:中国农业科学院)

# 浅析荧光 PCR 检测出现假阳性和假阴性的原因

黄露菡, 杨瑞龙, 郑妍

(潮州市动物卫生监督所, 广东 潮州 521000)

**摘要:** 荧光 PCR 技术的高敏感性导致检测结果易出现假阳性和假阴性。阳性样本和阳性对照污染是导致假阳性的原因; RNA 酶降解核酸是导致假阴性的重要原因。避免出现假阳性和假阴性检测结果需从实验室设置和管理、操作人员和试验器材管控入手。

**关键词:** 荧光 PCR; 假阳性; 假阴性

中图分类号: S854.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)06-0050-02

## Causes of False Positive and False Negative in Fluorescence PCR Detection

Huang Luhan, Yang Ruilong, Zheng Yan

(Chaozhou Animal Health Supervision, Chaozhou 521000, China)

**Abstract:** The high sensitivity of fluorescence PCR is easily lead to false positive and false negative. False positive is due to pollution from positive samples and the positive control. Rnase degradation is an important factor of false negative. False positive and false negative is avoided by improved laboratory setup and management, operating personnel and test equipment control.

**Key words:** Fluorescence PCR; false positive; false negative

在动物疫病监测中,病原学检测对防控疫病发挥着重要的作用。传统的病原学诊断需要进行病原分离、鉴定和毒力试验等操作,这种检测方法不仅耗时长、敏感性和准确性差,而且容易造成病原扩散,并且不适合大批样品快速检测<sup>[1]</sup>。随着检测技术的日益提高,荧光 PCR 检测技术因其具备操作简便、结果准确、诊断快速等优点逐渐取代传统的病原学诊断方法。荧光 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,它是一种在 PCR 体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 过程。同时,与普通 PCR 技术相比较,荧光 PCR 技术不仅污染少,自动化程度高,而且荧光 PCR 技术通过标准曲线对位置模板进行定量分析,实现了 PCR 技术从定性到定量的飞跃。然而,正因为荧光 PCR 技术具备极高的敏感性和提取样本核酸的微观性,导致荧光 PCR 检测结果容易出现假阳性或假阴性,对动物疫病检测结果有一定的影响。

### 1 导致假阳性原因

在荧光 PCR 检测中,由于样本核酸的扩增和结果分析这两个步骤是在同一密闭管中完成。因此,可以排除由于样本和扩增产物污染而导致假阳性的可能。那么,荧光 PCR 检测结果中出现假阳性的主要原因是由样本处理过程中产生的。

#### 1.1 样本采集过程

非一次性采样器具由于之前采样的痕量残留物含有本次检测的目的核酸而污染本次样品,造成假阳性<sup>[2]</sup>。另一原因是盛放样品器具密封不严造成样品间的污染。

#### 1.2 样本提取

样本提取过程中产生的气溶胶是造成假阳性的主要原因。据计算,一个气溶胶可有 48 000 个拷贝<sup>[3]</sup>。气溶胶是由试验操作中空气与液面的摩擦产生,如移液器反复吹打样品,打开 EP 管盖时的震动。产生假阳性的另一个原因是样品提取时

器材的使用违反操作规范, 如已吸取阳性样本或阳性对照的移液器水平放置, 导致移液吸头内的液体倒流污染移液器; 利用移液器吹打样本时用力过大, 液体倒吸进入移液器内部; 实验操作过程未能勤换手套导致阳性样本通过 EP 管盖、管口污染阴性样本; 另外提取样本时没有做到每吸取一个样本更换一个吸头, 导致吸取过阳性样品的吸头污染其他样品。

### 1.3 提取样本加入反应液

当与阳性对照或阳性样本相邻的反应管样本出现假阳性时, 通常是由于在将提取好的样本核酸加入八连管时, 阳性对照或阳性样本产生的气溶胶污染相邻的阴性样本所致。

## 2 导致假阴性原因

在动物疫病监测中, 病原学检测出现假阴性结果将对疫病防控工作的开展造成严重后果。PCR 检测结果出现假阴性主要有以下几个方面:

### 2.1 试验器具原因

试验中所提取的样本 RNA 被 RNA 酶降解是荧光 PCR 检测结果出现假阴性的一个重要原因。RNA 酶(Rnase)是导致 RNA 降解的最主要物质。试验器具容易受其污染。此酶非常稳定, 常规的高温高压处理不能使其灭活。试验中通常使用二乙基焦碳酸酯(DEPC)抑制 RNA 酶活性。因此若试验中使用的塑料器材未经 DEPC 处理, 或玻璃仪器及金属器具未经高温烘烤均可能存在 RNA 酶, 从而导致提取的阳性样本被降解。同时 RNA 酶广泛存在于人的皮肤和唾液, 因此操作者必须勤换手套, 佩戴口罩。

离心机对能否成功提取分离出 RNA 起到关键作用。离心机的关键在于离心加速度而不是转速, 根据牛顿定律可知离心力加速度与转速和有效半径有关。有效半径短的离心加速度就小, 同样的时间离心效果就差, 可能分离不出核酸导致假阴性<sup>[3]</sup>。同时分离 RNA 时需低温离心, 否则高速离心过程中产生大量的热量容易造成 RNA 降解。

### 2.2 试验操作原因

在动物疫病监测中, 通常采用 TRIZOL 法或离心柱硅基质膜提取 RNA。

利用 TRIZOL 法提取 RNA 出现假阴性主要有以下几方面原因: 第一, 加入  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇沉淀 RNA 可在离心管壁及管底形成一层胶状物, 因此离心必须注意离心管放置方向, 防止将沉淀在离心管

壁的 RNA 倒掉。第二, 配制 75%乙醇溶液洗涤沉淀在离心管壁的 RNA 时, 必须用经 0.1%DEPC 处理过的无菌蒸馏水进行配制。否则蒸馏水中可能含有 RNA 酶会分解掉沉淀的 RNA。第三, 对经乙醇洗涤过的 RNA 进行室温干燥时若时间过长会导致 RNA 不溶, 从而出现假阴性。第四, 提取后加入 DEPC 水的 RNA 最容易降解, 若不立即扩增应放于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存。

而采用离心柱硅基质膜提取 RNA 出现假阴性的原因主要有以下两方面: 第一, 将已加入裂解液的样本转移到吸附柱时, 吸入悬浮杂质堵塞吸附柱。第二, 未将洗脱液准确加入柱中央导致吸附的 RNA 未洗脱出来。

## 3 预防措施

### 3.1 实验室设置与管理

荧光 PCR 实验室必须分为 3 个区: 核酸提取区、反应液配置区、扩增区和结果分析区。各功能区必须形成单向流程的功能屏障, 避免区间的互相干扰, 防止核酸气溶胶对试验过程造成污染<sup>[4]</sup>。制定相应的管理制度, 保证仪器设备专区专用, 冷藏冷冻设备需显示实时温度, 保证样品及试剂质量。定时清洁实验室并用紫外灯消毒。试验废弃物应无害化处理。

### 3.2 实验操作人员

操作荧光 PCR 的检测人员必须具有一定荧光 PCR 检测技术的相关理论知识、操作技能及生物安全防护意识。检测人员必须严格按照质量体系规定的检测标准和检测方法操作。同时进行岗前培训和定期考核。

### 3.3 试验器材

试验过程中所用的一次性塑料耗材, 如吸头、离心管、八连管等均应采用无 RNA 酶的并且使用前进行高温高压处理。塑料器皿用 0.1% DEPC 水浸泡 4 h 后高温高压处理分解 DEPC。玻璃仪器或金属器具使用前须  $180^{\circ}\text{C}$  高温干烤 6 h 以上。

## 参考文献:

- [1] 张显朋, 兰婷妹, 赖笑娴. 实时荧光 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(3): 102-105.
- [2] 刘琴, 符玉娟, 兰玲. PCR 试验污染原因分析与对策[J]. 新疆畜牧业, 2012(6): 22-23.
- [3] 姚远, 张国富, 刘玉英. PCR 污染与对策及假阴性原因[J]. 实用医技杂志, 2002, 9(4): 276-277.
- [4] 刘贺. 荧光 RT-PCR 准确性的影响因素及控制策略[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(11): 26-28.

# 广东畜牧兽医科技 (双月刊)

2014 年第 39 卷第 1-6 期(总第 173-178 期)

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

## · 专题综述 ·

- 2013 年我国生猪市场回顾及 2014 年形势展望.....  
..... 虞 华(1-1)
- 冷鲜肉保水性的研究进展..... 冼理权, 董小英, 等(1-4)
- 2014 年春节猪价“旺季不旺”原因分析及后期走势  
研判 ..... 虞 华(2-1)
- 福利养猪理念在现行条件下的实践探讨..... 余德谦(2-4)
- 仔猪腹泻的原因及其综合防治 .....  
..... 何芙蓉, 邓奇风, 等(3-1)
- 畜禽规模化养殖场污染防治措施..... 蒋维政(3-5)
- 浅议副猪嗜血杆菌病的鉴别诊断及防治措施.....  
..... 高亚军(3-9)
- 狂犬病毒磷蛋白的相关研究概况.....  
..... 郑韶结, 施赫赫(3-12)
- 氟苯尼考在不同动物体内的药动学研究进展 .....  
..... 王秀枝(4-1)
- 种鸡强制换羽技术要点..... 韩文格(4-4)
- 马流感病毒的跨物种传播及鸟类在其传播中的作用探讨  
..... 张海明, 沈 丹, 等(5-1)
- 2014 年前三季度我国生猪生产形势分析及后期走势判断  
..... 虞 华, 彭 莉(5-5)
- 支原体表面蛋白的相变与抗原变异机制 .....  
..... 胡美容, 周燕芬, 等(6-1)
- 鸡蛋中兽药残留形成过程及防控措施分析.....  
..... 李亚男, 白景英, 等(6-7)
- 猪胎衣的主要成分及其应用进展.....  
..... 王 琪, 吴传文, 等(6-12)
- 黄芪多糖在肉鸡养殖业上的研究与应用进展.....  
..... 刘瑞生(6-15)

## · 畜牧技术 ·

- 脂肪酶对蛋鸡生产性能的影响试验.....  
..... 赵必迁, 李学海(1-7)
  - 季节对育成母牛产粪量及粪污染物排放量的影响...  
..... 张振伟, 庞伟英, 等(1-10)
  - 中草药制剂苦木汤对仔猪生产性能的影响试验.....  
..... 李国柱, 陈 灏, 等(1-13)
  - 利用氯前列烯醇控制母猪白天分娩的效果观察与分析  
..... 吴同山, 李月文(2-7)
  - 中草药制剂开胃散对仔猪生产性能的影响试验.....  
..... 陈 灏, 李国柱(2-10)
  - 山羊胚胎移植手术中复合麻醉剂的使用效果观察.....  
..... 郑 梓, 王晓元, 等(2-13)
  - 维持种鸡产蛋持续性的技术要点..... 韩文格(3-15)
  - 浅谈种猪企业如何开展猪育种工作.....  
..... 陈预明, 伍锦华, 等(3-17)
  - 广东惠州生猪养殖现状调查及分析..... 骆宏机(4-6)
  - 仙湖肉鸭 B 系生长发育规律与生长曲线分析.....  
..... 吕敏芝, 董 瑜, 等(4-11)
  - 关于规模化猪场生物安全体系建设的几点体会.....  
..... 庄汝柏, 张 洁, 等(5-9)
  - 鹅的选种与授精技术..... 陈海南, 郭 艳(5-15)
  - 当前我国禽蛋生产形势分析及后期走势研判.....  
..... 虞 华, 彭 莉(6-19)
  - 如何提高平养肉种鸡的受精率..... 韩文格(6-22)
- ## · 兽医临床 ·
- 三种抗原检测 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 猪流感病毒抗体的比较.....  
..... 杨 倩, 薛春宜, 等(1-16)

- 丹顶鹤全群驱虫效果分析···梁金华, 冼永杰, 等(1-21)
- 浅谈基层如何进行猪“瘦肉精”残留检测·····  
·····范瑞环, 罗英娇, 等(1-23)
- 新型鸭呼肠孤病毒 QY 株 S3 基因克隆与序列分析·····  
·····孔 丰, 袁远华, 等(2-16)
- 一株猪链球菌的分离鉴定与药敏试验·····  
·····吴海冲, 邓千臻(2-20)
- 猪链球菌 2 型的分离鉴定与药敏试验·····梁金华(3-19)
- 广东东莞地区猪肺炎支原体感染的血清学调查·····  
·····万庆文, 谢王韵, 等(3-22)
- 洛美沙星对人工诱发大肠杆菌病鸡的疗效观察·····  
·····刘裕玲, 黄华强(3-24)
- 广西某集约化猪场猪伪狂犬病的监测及净化·····  
·····蒋建国, 张显浩, 等(4-15)
- 广东江门地区 2011-2013 年活禽交易市场禽流感病原学  
监测数据分析·····陆巧芬, 曹建伟, 等(4-18)
- 广东五种常见中草药的体外抑菌试验·····  
·····袁 婷, 张广源(4-20)
- 合成囊素三肽对猪瘟疫苗免疫效果的影响·····  
·····丁丽军, 潘陈苗, 等(5-18)
- 供港活猪 4 种疫病抗体水平监测及免疫效果分析·····  
·····周 宇, 朱事康, 等(5-21)
- 广州地区生猪健康状态调查·····  
·····段晓冬, 谭 海, 等(5-24)
- 高致病性猪蓝耳病弱病毒疫苗与灭活疫苗的免疫效果  
评估试验·····刘承军, 王海丽, 等(6-24)
- 生猪漂白粉中毒的病理变化观察·····  
·····彭南秀, 肖 杰, 等(6-26)
- 试验研究·
- 新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测方法建立与初步应用··  
·····孔 丰, 袁远华, 等(1-24)
- 荧光定量 PCR 检测 2 型猪圆环病毒方法的建立·····  
·····敖艳华, 穆光慧, 等(1-28)
- 卵丘细胞对卵母细胞成熟、受精和胚胎发育的影响  
试验·····石俊松, 罗绿花, 等(1-32)
- 蒲公英、北五味子水煎剂对鸡新城疫疫苗免疫效果的  
影响·····杨立萍, 孙 心, 等(2-22)
- 莜术油-β-环糊精包合物的制备工艺及其稳定性研究··  
·····严 楚, 刘志昌, 等(2-25)
- 一株猪丹毒杆菌的分离鉴定及其对活疫苗免疫猪的  
攻毒试验·····王千菊, 陈 坚, 等(2-29)
- 自动尿囊液收获机胚液收集吸头的改进及其在禽流感  
疫苗半成品生产上的初步应用·····  
·····赖汉漳, 陈瑞爱, 等(2-34)
- 小麦替代玉米对生长育肥猪生长性能、养分消化率及  
经济效益的影响·····骆宏机(3-26)
- 当前主要动物疫病监测抽样数量的探讨·····  
·····卢受昇, 丁红星(3-31)
- 集装箱内食用动物产品外包装臭氧消毒方法的研究  
·····杨仕青, 陈 娜, 等(3-36)
- 纤维素酶对肉鸡生产性能的影响·····  
·····李岑曦, 郭荣富(4-24)
- 超高效液相色谱法测定桔百颗粒中的橙皮苷·····  
·····林仙军, 周 炜, 等(4-27)
- 单列式小水体饲养模式对种用狮头鹅繁殖性能的影响  
·····刘思扬, 林澄丰, 等(4-30)
- 1 株广东鸡源新城疫病毒的分离鉴定和毒力基因分析  
·····黎先伟, 钟植文, 等(4-34)
- 添加剂预混合饲料“健美素”对生长肥育猪生产性能  
的影响·····沈浩铨, 黄露茜, 等(4-38)
- 猪卵丘包裹层数与猪卵母细胞质量的相关性研究·····  
·····周 荣, 石俊松, 等(5-27)
- 饲料中添加功能性诱食肽对猪生长性能的影响·····  
·····张玉宏, 温晓鹿, 等(5-30)
- 植物发酵多糖对猪生长性能的影响试验·····

.....冯晓声, 贾爱卿, 等(5-34)

一种新型棚舍对北极狐生产性能影响的研究.....

.....朱建国, 梁晓军, 等(5-37)

广东地区近2年禽流感H<sub>9</sub>亚型HA基因的序列分析...

.....卢受昇, 高慧敏, 等(6-29)

猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗病毒培养条件的  
优化.....周靓靓, 孙心, 等(6-33)

鸭瘟病毒PCR快速检测方法的建立.....

.....于新友, 李天芝, 等(6-36)

·华南宠物园地·

大豆卵磷脂在犬粮中的应用前景.....

.....何小军, 左建军, 等(1-36)

糖皮质激素类药物在宠物临床中的使用准则.....

.....刘健红, 张善财(1-41)

电子芯片在犬籍管理中的应用现状.....

.....黄婧溪, 杨锦东, 等(2-37)

浅谈中国沙皮狗的选配.....张善财, 刘健红(2-40)

一例猫急性肾衰竭及膀胱穿孔的诊断与治疗.....

.....张清华, 罗志贤, 等(2-43)

一例犬胫骨骨折的治疗.....吕颜枝(2-45)

犬异食癖的形成原因及其防治方法.....

.....奚子英, 陈修强, 等(3-39)

一例犬边虫病的诊断和治疗.....

.....阳玉彪, 麦丽华, 等(3-42)

一例猫糖尿病的诊治体会...陈灏, 李国柱, 等(3-45)

广州地区比格犬的发情规律分析.....

.....胡敏华, 张志光, 等(4-41)

一例犬脾脏血管肉瘤的诊治.....宾文英, 陈义洲(4-44)

一例犬良性阴道纤维细胞瘤的诊治.....

.....许建国, 刘晓娜, 等(4-47)

一例犬恒齿发育不良病例诊治报告——齿龈重建术在  
犬口腔疾病中的应用...余来森, 袁小兵, 等(5-40)

一例犬附红细胞体的诊治.....吴海冲, 邓千臻(5-43)

犬的繁殖育种技术.....于丹丹, 刘清神(5-46)

一例犬髌骨双侧性内方脱位的诊断与治疗.....

.....任婧(6-39)

一例犬类固醇反应型脑炎-动脉炎的临床病例报告..

.....李晋飞, 薛剑, 等(6-42)

自发性Beagle犬前列腺增生模型的建立.....

.....胡敏华, 龙海斌, 等(6-45)

·经验交流·

中职畜牧兽医专业人才需求调查及专业改革探索研究  
.....陈琼, 刘鹤翔, 等(1-44)

猪口蹄疫免疫失败的原因和对策.....

.....黄万世, 吕英然, 等(1-50)

南方冬季蛋鸡的防寒保暖措施.....

.....冼理权, 何炳强, 等(2-47)

浅谈东莞市对畜禽产品质量的监管.....

.....曾秋菊, 钟敏菱, 等(2-50)

由美国猪流行性腹泻疫情引发的进境动物检疫思考..

.....许如苏, 纪强, 等(3-47)

东莞市石碣镇待宰生猪口蹄疫抗体水平监测与分析...

.....黎锦泉, 李月文, 等(3-49)

浅谈广东江门地区黑山羊饲养易出现的问题及其解决  
办法.....邓志行(3-51)

广东东莞地区猪传染性胸膜肺炎的血清学调查.....

.....徐振娜, 洪伟彬, 等(4-49)

斑马肠梗阻手术治愈两例.....张天佑, 黄勉(4-51)

孵化场如何科学存放雏鸡.....郝春光(5-49)

一起蛋鸭鸭瘟感染的诊治...陈哲通, 袁远华, 等(5-51)

湘村黑猪选育中的疫病防控措施.....

.....刘建, 杨文莲, 等(6-47)

浅析荧光PCR检测出现假阳性和假阴性的原因.....

.....黄露茜, 杨瑞龙, 等(6-50)