

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编: 蒋宗勇

副 主 编: 孙彦伟

责任编辑: 孙彦伟 岑俏梅

编委主任: 蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 廖 明 曾振灵

毕英佐 王贵平 舒鼎铭 孙彦伟

蔡建平 王政富 刘彩霞 岑俏梅

特邀编委:

陈 峰 余丽明 徐建浩 黄小建

陈小云 郑庆禄 贺湘仁 李 岩

林旭堃

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

E-mail:gdmsyjkj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:4月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

目 录

·专题综述·

- 禽流感病毒神经氨酸酶的研究进展.....任丽伟, 陈 强, 等(3)
- 浅谈三聚氰胺的毒性及其在饲料中的检测方法.....田树清, 范艳平(7)
- 中草药防治奶牛乳房炎的研究进展.....龚平阳, 肖兵南, 等(9)

·畜牧技术·

- 影响小规模猪场正常发展的主要原因分析与改进措施.....吴同山, 李旭金, 等(12)
- 波尔山羊与本地白山羊杂交改良试验.....刘东军(14)

·兽医临床·

- 鸡腺胃型传染性支气管炎的实验病理学研究.....魏昆鹏, 郭万华, 等(16)
- 鸡肺石蜡切片 AgNOR 染色方法的探讨.....曾健滢, 冯宇麟, 等(19)
- 中西医结合治疗亚洲黑熊肝硬化继发腹水症.....李纪春, 陈 武, 等(21)

·试验研究·

- 培养液磷含量和 pH 值对鸡离体小肠磷吸收的影响....徐运杰, 方热军, 等(23)
- 樱桃谷鸭白介素 18 基因的克隆与原核表达.....龚朋飞, 周庆丰, 等(28)
- 猪源流感病毒 NS1 基因的克隆及原核表达.....李 敏, 向 华, 等(31)
- 圆环病毒 2 型人工感染猪的排毒情况及体内分布规律的初步研究.....何逸民, 罗玉均, 等(35)
- 复方长效土霉素注射液的工艺研究及疗效试验.....朱 斌, 李龙瑞(38)

·宠物园地·

- 四种手术方法治疗犬髌关节脱位的效果比较.....周庆国, 黄 毅, 等(40)
- 犬肾结石合并膀胱结石一例及其分析.....陈 瑞, 王 飞, 等(43)
- 犬皮肤病的诊断与防治措施.....李成梅, 古飞霞, 等(45)

·经验交流·

- 关于完善能繁母猪保险政策的思考.....颜卓友(48)
- 非洲狮附红细胞体病的诊治.....彭仕明, 吴智斌, 等(50)
- 一例疑似猪水肿病的诊疗.....温青泉, 罗英娇(52)

·信息之窗·

- 我国种猪长期从国外进口被动局面有望改善.....(15)
- 2009“永顺杯”优秀论文评选启事.....(20)
- 2008“永顺杯”优秀论文评选结果.....(后一)

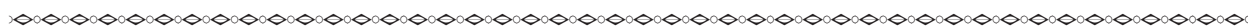
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2009 Volume 34, Number 2 (Total No.144)

Main Content

- Research progress of neuraminidase of avian influenza virus* Ren Liwei, Chen Qiang, et al (3)
- Toxicity and the detection methods of melamine in feedstuffs* Tian Shuqing, Fan Yanping (7)
- The treatment effect of Chinese herbal medicine on the mastitis of milch cows*.....Gong Pingyang, Xiao Bingnan, et al (9)
- Discuss and countermeasure for critical factors influencing the development of small-scale pig farms*
.....Wu Tongshan, Li Xujin, et al (12)
- The improvement trial on the crossing of Boer goat with white goat* Liu Dongjun (14)
- Experimental pathological research of glandular stomach type avian infectious bronchitis*.....
.....Wei Kunpeng, Guo Wanhua, et al (16)
- The application of AgNOR staining technique in the parafin section for the lungs of chicken*
.....Zeng Jianying, Feng Yulin, et al(19)
- The treatment of ascites due to cirrhosis of Asiatic black bears by the integration of traditional Chinese medicine and western
medicine*..... Li Jichun, Chen Wu, et al (21)
- The influence of phosphate levels and pH in culture medium on phosphorus absorption of small intestine in chickens*
..... Xu Yunjie, Fang Rejun, et al(23)
- Cloning of interleukin-18 mature protein gene of cherry valley duck and its expression in Escherichia coli*.....
..... Gong Pengfei , Zhou Qingfeng, et al(28)
- Cloning and prokaryotic expression of NS1 Gene of H3N2 Swine Influenza Virus* Li Min, Xiang Hua, et al(31)
- Virus shed and virus distribution in artificial challenge pigs with porcine circovirus type 2* He Yimin, Luo Yujun, et al (35)
- Comparision among the effects of four kinds of operations on hip joint luxation in dogs*.....
..... Zhou Qingguo, Huang Yi, et al (40)
- Diagnosis and treatment of canine dermatosis* Li Chengmei, Gu Feixia, et al(45)



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

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

Chief Editor:JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

禽流感病毒神经氨酸酶的研究进展

任丽伟, 陈 强, 徐贵江, 李碧春*

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 神经氨酸酶是禽流感病毒的两种表面糖蛋白之一, 是一种由AIV基因组第6节段编码的II型糖蛋白。宿主细胞膜上的唾液酸(SA, 又名神经氨酸)是流感病毒的主要受体。流感病毒与宿主细胞膜上SA受体结合后, 才能进入细胞。而神经氨酸酶可以降解AIV识别的宿主细胞膜上的受体, 抑制病毒进入细胞。神经氨酸酶的这一独特功能特点使其成为国内外抗禽流感病毒研究的热点之一, 同时也为制备抗禽流感转基因家禽提供了理论依据。本文简要综述了禽流感病毒的背景知识, 着重介绍了神经氨酸酶的结构与功能以及目前国内外神经氨酸酶的研究状况, 并对其今后的研究和应用进行展望。

关键词: 神经氨酸酶; 禽流感病毒; 抑制剂

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0003-04

转基因家禽是当前的研究热点之一。神经氨酸酶可以降解AIV识别的宿主细胞膜上的唾液酸受体, 抑制病毒进入细胞。神经氨酸酶的这一功能特点使其在培育抗禽流感转基因家禽方面具有重要作用。目前对于神经氨酸酶的研究主要是出于防治禽流感, 而在培育抗病转基因家禽方面研究较少, 对其进行深入的研究, 可以为今后家禽生产中禽流感病毒诊断及抗病育种提供新的思路和途径。

1 禽流感病毒

流感是由流感病毒感染引起的人类或动物的流行性感冒疾病。流感病毒的血凝素和神经氨酸酶对粘蛋白有亲和力, 因此被称为粘病毒, 后统称正粘病毒科^[1]。根据病毒核蛋白和基质蛋白抗原性的差异, 流感病毒可分为甲(A)、乙(B)、丙(C)3型。3个型没有共同抗原, 其中A型流感病毒能够感染人、猪、马和禽类; C型流感病毒主要感染人和猪; 而B型流感病毒仅感染人类。即3个型都能感染人。尤其A型流感的感染范围更广, 能以流行的形式出现, 发病急, 蔓延快, 危害大。禽流感病毒是负链RNA病毒, 在病毒分类学上属于正粘病毒科中的A型流感病毒属, 人、家畜家禽及许多野生动物都能成为它们的宿主。根据流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase, NA)的抗原性不同, 可将流感分成不同的亚型(HxNy)。HA有16种抗原型(H₁-H₁₆), NA有9种抗原型(N₁-N₉), 不同的HA和NA可以组成不同亚

型的流感病毒, 理论上流感病毒有144种亚型^[2]。AIV基因组由8个节段单股负链RNA片段组成。AIV呈球形, 有囊膜, 其表面主要有2种糖蛋白, 即血凝素和神经氨酸酶。其中神经氨酸酶是一种II类跨膜糖蛋白, 是构成禽流感病毒纤突的一种重要蛋白成分, 是由AIV基因组节段6所编码, 该基因长约1.4 kb左右, 编码约450~470个氨基酸^[1]。

2 神经氨酸酶(NA)的结构与功能

NA呈蘑菇状, 以四聚体形式存在, 它的一级结构包括氨基端胞浆尾、非极性跨膜区、茎部和头部。NA不同的结构区域对NA的活性及流感病毒的复制扩散都有影响。

神经氨酸酶的氨基端胞浆尾包括6个氨基酸残基, 它们是MNPNQK。根据目前所检测得不同的NA序列, 发现氨基端胞浆尾非常保守, 在所有的A型流感病毒中都相同, 在已经鉴定的所有A、B型流感病毒中都高度保守, 表明这一序列可能具有重要功能^[3]。Gracia-Sastre等^[4]研究表明, 缺失NA的氨基端胞浆尾不影响NA蛋白转移至病毒颗粒表面和NA的酶活性。Jin等^[5]研究表明, NA氨基端胞浆尾起到控制病毒形状的作用。Mitnaul等^[6]研究表明, NA氨基端胞浆尾在病毒复制过程中不是必需的, 但是去掉NA的氨基端胞浆尾会影响NA蛋白的表达量以及NA蛋白的稳定性, 同时还会影响病毒的毒力和改变病毒颗粒的形状。

神经氨酸酶头部为盒子状, 包含NA蛋白抗原

决定簇和酶活性中心。NA 有催化活性, 是一种糖苷外切酶, 具有从 α -糖苷键上除去唾液酸和从病毒感染的细胞上除去唾液酸残基的功能。这一功能与它的头部结构是密切相关的, 且在病毒复制与扩散中具有重要的作用, 主要表现在协助病毒粒子进入细胞和子代病毒从表面释放, 防止病毒粒子聚集。已有大量的实验证实, 当病毒粒子 NA 的酶活性降低时会导致病毒不能有效地从细胞表面释放, 使得大量新生的子代病毒聚集在细胞表面^[6]。

NA 非极性跨膜区起着固定和作为信号肽的双重功能。Spiess 等^[7]用去唾液酸糖蛋白受体的方法证实, 跨膜蛋白进入粗面内质网的信号位于蛋白的非极性跨膜区, 同时非极性跨膜区只有一小部分氨基酸序列起到信号肽作用, 其它的氨基酸残基只具有固定作用。Sivasubramanian 等^[8]通过在 NA 蛋白非极性跨膜区进行点突变的方法发现, 跨膜区的一些特定的氨基酸区域在 NA 蛋白转运至粗面内质网上起信号作用。而 Brown 等^[9]用缺失跨膜区一段氨基酸的方法证实, NA 蛋白的跨膜区的前 20 个氨基酸起到信号肽的作用。

NA 头部和非极性跨膜区之间的部位是茎部, 一般认为茎部长度约为 40 个氨基酸。Blok 等^[10]在 1982 年发现 H₁N₁ 亚型禽流感病毒中, NA 基因有缺失的情况, 结果导致 NA 蛋白茎部有 11~16 个氨基酸缺失, 茎部氨基酸的缺失会引起 NA 蛋白茎部的缩短, 但是不会引起 NA 抗原性和其神经氨酸酶活性位点的改变; 并认为茎部会使 NA 的头部远离病毒膜, 以利于 NA 酶活性的发挥。后来 Els^[11]和 Castrucci^[12]分别在 1985 年和 1993 年证实 H₁N₁ 病毒的 NA 在缺失了 11~16 个氨基酸后, 结果降低了病毒对较大底物的降解能力, 但是对小底物的降解能力影响不明显, 另外, 也降低了病毒从红细胞上的降解能力, 而红细胞解凝试验则是衡量子代病毒从出芽细胞释放能力的标尺。可见, 茎部的长度会影响神经氨酸酶的活性, 短茎部 NA 的酶活性位点太靠近病毒颗粒膜, 使得底物不能进入, 从而不能有效释放子代病毒, 甚至会使得子代病毒自我聚集在一起而毁坏。目前, NA 的茎部缺失 20 个氨基酸是 H₅N₁ 病毒中较常见的一突变现象, 对此报道也较多, 有学者认为这种缺失可能是 H₅N₁

由水禽向陆生禽类发生适应的标志。另外, 通过对 NA 进行基因操作, 发现茎部的长度在决定病毒宿主的范围中起作用。

NA 还与病毒的宿主特异性及病毒的毒力有关。NA 作为流感病毒表面的一种重要抗原, 在病毒感染宿主细胞时, 主要起着识别细胞表面的流感病毒受体, 促进病毒进入靶细胞内的作用。此外, 神经氨酸酶对流感病毒致病性也有作用, 它能改变流感病毒的另一种表面糖蛋白——血凝素的糖基部分, 从而增强一些菌株的毒力; 流感病毒 NA 也能直接活化潜在的转化生长因子 β 。这种活化细胞因子水平的增高能引起细胞凋亡。

3 神经氨酸酶的研究现状

目前, 国内外就神经氨酸酶的研究主要集中在以下几个方向:

3.1 NA 基因改造的研究 国内外的一些研究机构及高校分子实验室都在做或已经做了不同亚型 NA 基因的序列克隆, 原核、真核表达载体的构建及诱导表达。此外, 有人将流感病毒 NA 基因反转录克隆到质粒可表达的位点上, 构建成 NADNA 疫苗。如: 谢京国等^[13]进行的禽流感病毒 NA 基因的“自杀性”DNA 疫苗研究; 张平静等^[14]进行的有关 NA 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效力评估。NADNA 疫苗能对同型流感病毒的攻击起重要保护作用。另外, NA 基因还用于禽流感亚型的鉴定。Herrmann 等^[15]使用 NA 基因全长测序和序列比对法来鉴定 NA 亚型, 该方法具有准确性好、重复性强等特点, 已被许多实验室作为 NA 亚型鉴定的标准方法。王秀荣等^[16]建立了禽流感病毒 N₁ 和 N₂ 亚型神经氨酸酶 RT-PCR 鉴别方法, 对 50 份样品进行盲检, 准确率为 98%。仇保丰^[17]根据 9 种亚型 NA 序列的高度保守区设计了 9 对引物建立一种 RT-PCR 方法, 该方法能快速、灵敏和特异地鉴别禽流感病毒的 9 种 NA 亚型。

另外, 据英国《泰晤士报》报道, 英国科学家正在培育抗 H₅N₁ 型禽流感病毒的转基因鸡, 以应对这种高致病性病毒对人类社会的长期威胁^[18]。这项研究由剑桥大学和苏格兰罗斯林研究所的科学家负责, 科学家们已经通过添加遗传物质片段的方法, 使鸡细胞具备了抵抗 H₅N₁ 型禽流感病毒的能力。这也是最早关于抗禽流感转基因家禽研

究的报道。而在国内也有学者将 NA 基因用于转基因鸡的研究,如复旦大学严华祥等^[19]就进行了抗禽流感家禽遗传育种的初步研究。扬州大学动物科学与技术学院分子实验室也很早就开展了转基因鸡的研究,且取得了一些进展。

3.2 NA 免疫学功能的研究 抗流感病毒 NA 的抗体对流感有保护作用。NA 蛋白是 AIV 两个主要表面抗原之一,作为体液免疫的靶抗原,可诱导机体产生特异性抗体,抑制病毒从感染细胞释放,从而减少病毒增殖。研究表明,随着体内抗流感病毒 NA 抗体的水平增加,流感病毒引起的呼吸道疾病发生率下降,甚至在一定程度上只出现隐性感染不表现临床症状。Johansson 等^[20]研究表明 NA 抗体不具备中和病毒感染的能力,它只是抑制病毒从细胞表面释放再感染其他细胞,从而减少了病毒的繁殖,使病毒感染小鼠后在体内的增殖数量低于使小鼠发病的阈值。赵小东等^[21]针对流感病毒感染机体呼吸道的特点以非复制型腺病毒为载体,构建了表达流感病毒神经氨酸酶基因的重组腺病毒,并在动物实验中初步研究其免疫效果。小鼠经重组病毒免疫后血清中能产生 IgG 和 IgA 抗体,在呼吸道黏膜组织中也能检测到抗流感病毒的 IgA。结果表明重组腺病毒可诱导机体产生良好的免疫效果。周旭等^[22]研究禽流感病毒神经氨酸酶基因在小鼠中的免疫效果,结果表明:神经氨酸酶基因免疫小鼠抗异型流感病毒攻击存活率为 75%,神经氨酸酶基因与血凝素基因联合免疫小鼠抗异型流感病毒攻击存活率为 100%。陈则^[23]用 BALB/C 小鼠为模型,检测 A 型流感病毒血凝素、神经氨酸酶、基质蛋白 DNA 疫苗抗流感能力。研究表明:血凝素、神经氨酸酶 DNA 疫苗能提供有效的抗流感保护;血凝素、神经氨酸酶和基质蛋白联合免疫动物提供最佳免疫保护。乔传玲等^[24]通过禽流感病毒 HA-NA 基因重组禽痘病毒的构建表达及其免疫效力的研究,结果表明:重组禽痘病毒在鸡体内都能够稳定复制和高效表达外源基因,并可诱导机体产生特异性抗体;表达产物中 NA 和 HA 是最具有免疫原性的,二者的共表达能够使免疫鸡完全抵抗 H₅N₁ 和 H₇N₁ 亚型 HPAIV 的致死攻击。美国弗吉尼亚大学 Mishin 等用无神经氨酸酶的甲型流感病毒变异株对雪貂鼻内免疫的保护效果研究结果表

明,作为流感减毒活疫苗的疫苗病毒可以不含 NA 抗原,缺 NA 基因的流感病毒毒力明显降低,也可作为一种病毒载体^[25]。

3.3 NA 抑制剂的研究 流感病毒表面的神经氨酸酶高度保守的活性位点相对稳定,NA 活性是病毒生长必不可少的条件,NA 活性部位的任何畸变都会使其活性降低。通过阻断 NA,可使病毒颗粒聚集在一起,黏着于细胞表面,不能感染其他细胞。由于 NA 的活性可被特异性的抑制物或抗体所抑制,从而使 NA 丧失吸附融合复制装配和出芽等功能。因此,根据这一原理,国内外研究出许多抗流感药物,如:神经氨酸酶抑制剂,对 A 型和 B 型流感病毒均有抑制作用,目前已成为研究热点。

临床上大量应用的神经氨酸酶抑制剂主要有:①扎那米韦(Zanamivir),这是第一个抗流感病毒的神经氨酸酶抑制剂;②奥司他韦(Osetamivir);③普瑞米韦(Peramivir);另外,还有一些新的神经氨酸酶抑制剂正在研制与检验过程中。

神经氨酸酶是流感病毒复制和扩散的关键酶。病毒颗粒的释放需要借助其对病毒表面糖蛋白上和细胞上的受体的破坏,并使唾液酸和细胞表面蛋白之间的化学键断裂,使新生成的病毒颗粒与已感染的细胞分离,促进病毒颗粒的释放,增强对靶细胞周围黏液层的穿透力,进而感染正常细胞。神经氨酸酶抑制剂可选择性地抑制神经氨酸酶的活性,阻止子代的病毒颗粒在宿主细胞的复制和释放,从而有效地预防流感和缓解症状。

流感作为严重危害公众健康的病毒性传染病,始终伴随着人们的生活,高度变异的流感病毒表面抗原是流感流行的重要原因。而流感病毒的变异使人类无法获得对流感的终身免疫力。面对禽流感的威胁,神经氨酸酶抑制剂成为对抗流感病毒的重要手段。目前,依据神经氨酸酶抑制剂抑制病毒的出芽繁殖原理的疫苗正在研制过程中。

4 问题与展望

可能因为禽流感突破种间障碍可以感染人的原因,使得国内外专家和学者在禽流感疫苗及神经氨酸酶抑制剂等防止禽流感感染人方面做了大量的研究。然而,在抗禽流感转基因家禽这方面的研究却很少。如何通过转基因技术让禽类先天就能获得抗禽流感的能力呢?

扬州大学动物科学与技术学院分子实验室成员在课题牵头人李碧春教授的指导下, 试图从家禽遗传育种的角度, 进行抗病及抗禽流感转基因鸡的研究, 目前, 实验室在利用鸡 Mx 蛋白(该蛋白的功能是可以延迟发病期)的抗病机制制备抗病转基因鸡方面已经取得了很大进展^[26]。接下来要做的是将 NA 基因和 Mx 蛋白基因连接并定向插入真核表达载体, 让重组表达载体能在鸡体内表达, 构建能表达 NA-Mx 蛋白基因的转基因鸡技术平台, 并期望在 F1 代可以稳定表达, 从而制备出抗禽流感的新型转基因鸡。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H₆) obtained from black-headed gulls[J]. *J Virol*, 2005, 79(5):2814-2822.
- [3] 王全英, 乔传玲, 申之义. 禽流感病毒神经氨酸酶的结构及其生物学功能[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(12):40-43.
- [4] Garcia-Sastre A, Palese P. The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes[J]. *Virus Res*, 1995, 37(1):37-47.
- [5] Jin H, Leser G P, Zhang J, et al. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape[J]. *EMBO J*, 1997, 16(6):1236-1247.
- [6] Mitnaul L J, Castrucci M R, Murti K G, et al. The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase(NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication[J]. *J Virol*, 1996, 70(2):873-879.
- [7] Spiess M, Handschin C. Deletion analysis of the internal signal-anchor domain of the human asialoglycoprotein receptor H₁[J]. *EMBO J*, 1987, 6(9):2683-2691.
- [8] Sivasubramanian N, Nayak D P. Mutational analysis of the signal-anchor domain of influenza virus neuraminidase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(1):1-5.
- [9] Brown D J, Hogue B G, Nayak D P. Redundancy of signal and anchor functions in the NH₂-terminal uncharged region of influenza virus neuraminidase, a class II membrane glycoprotein[J]. *J Virol*, 1988, 62(10):3824-3831.
- [10] Blok J, Air G M. Block deletions in the neuraminidase genes from some influenza A viruses of the N1 subtype[J]. *Virology*, 1982, 118(1):229-234.
- [11] Els M C, Air G M, Murti K G, et al. An 18-amino acid deletion in an influenza neuraminidase[J]. *Virology*, 1985, 142(2):241-247.
- [12] Castrucci M R, Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus[J]. *J Virol*, 1993, 67(2):759-764.
- [13] 谢京国, 方六荣, 陈焕春. 禽流感病毒 HA/NA 基因的“自杀性”DNA 疫苗研究[D]. 华中农业大学, 2006.
- [14] 张平静, 吴宝成, 陈化兰. 共表达 H5N1 亚型高致病性禽流感病毒 HA 和 NA 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效力评估[D]. 福建农林大学, 2006.
- [15] Herrmann B, Larsson C, Zwegberg B W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA) [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1):134-138.
- [16] 王秀荣, 李冬梅, 邓国华, 等. 禽流感病毒 N₁ 和 N₂ 亚型神经氨酸酶 RT-PCR 鉴别方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(4):9-13.
- [17] 仇保丰. AIV 神经氨酸酶基因 RT-PCR 亚型鉴别方法的建立以及华东地区家鸭 AIV 神经氨酸酶基因的进化分析[D]. 扬州大学, 2008.
- [18] 曹丽君. 英国科学家正在培育抗 H5N1 型禽流感病毒的转基因鸡[N]. 新华网.
- [19] 严华祥. 抗禽流感家禽遗传育种的初步研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [20] Johansson B E, Matthews J T, Kilbourne E D. Supplementation of conventional influenza A vaccine with purified viral neuraminidase results in a balanced and broadened immune response[J]. *Vaccine*, 1998, 16(9-10):1009-1015.
- [21] 赵小东, 韩峰, 王艳, 等. 表达流感病毒神经氨酸酶基因的重组腺病毒的构建[J]. *中国病毒学*, 2003, 18(3):213-216.
- [22] 周旭, 李益民, 侯玲, 等. 流感病毒血凝素基因、神经氨酸酶基因在小鼠中的免疫效果观察[J]. *微生物学免疫学进展*, 2001, 29(1):15-19.
- [23] 陈则. A 型流感病毒血凝素、神经氨酸酶 DNA 疫苗研究[J]. *微生物学杂志*, 2003, 23(5):1-4.
- [24] 乔传玲, 姜永萍, 李呈军, 等. 禽流感重组禽痘病毒 rFPV. HA-NA 活载体疫苗的研究[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(1):46-49.
- [25] 丁文正. 用无神经氨酸酶的甲型流感病毒变异株对雪貂鼻内免疫的保护效果[J]. *国际生物制品学杂志*, 2006, 29(3):140.
- [26] 倪黎纲, 吴晓伟, 程旭梅, 等. 鸡 Mx 蛋白基因诱变修饰及抗病活性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(6):785-789.

浅谈三聚氰胺的毒性及其在饲料中的检测方法

田树清, 范艳平

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 检测“伪蛋白”三聚氰胺, 对保证饲料的质量安全、维护人们的身体健康和促进对外贸易具有重要意义。而传统的“凯氏定氮法”检测蛋白质含量时, 不能够区分这种“非蛋白氮”, 致使一些不法厂商, 在产品中添加三聚氰胺粉以提高蛋白质含量。本文就三聚氰胺的毒性及其在饲料中的几种检测方法进行了综述。

关键词: 三聚氰胺; 毒性; 检测方法

中图分类号: S816.17

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0007-02

1 三聚氰胺简介

1.1 三聚氰胺的概念 三聚氰胺(melamine), 是一种重要的氮杂环有机化工原料, 目前是重要的尿素后加工产品。其拉丁名为 cyanuramide, 简称三胺, 学名三氨基(2,4,6-三氨基-1,3,5-三嗪), 别名蜜胺、氰尿酸、三聚酰胺。

1.2 三聚氰胺的理化性质 三聚氰胺为纯白色单斜棱晶体, 无味。分子式: $C_3N_6H_6$, 分子量: 126.12, 含氮量为 66% 左右。熔点 $345^{\circ}C$, 密度 $1.573 g/cm^3$, 沸点升华, 能微溶于水及乙醇, 不溶于醚、苯和四氯化碳。三聚氰胺呈弱碱性, 能够与各种酸反应生成三聚氰胺盐。在中性或弱碱性条件下, 与甲醛缩合而成各种羟甲基三聚氰胺, 但在弱酸性中(pH 5.5~6.5)与羟甲基的衍生物进行缩聚反应而生成树脂产物。遇强酸或强碱水溶液水解, 胺基逐步被羟基取代, 先生成三聚氰酸二酰胺, 进一步水解生成三聚氰酸一酰胺, 最终生成三聚氰酸。

在饲料中少量添加三聚氰胺即可大大提高蛋白含量。因为每个三聚氰胺分子中都含有 6 个氮原子, 而在原料的粗蛋白检测过程中, 用浓硫酸消化这一过程可以将三聚氰胺分解掉, 这样在最后的计算中, 三聚氰胺中的氮原子即可提高粗蛋白的比率, 造成蛋白含量虚假增高^[1]。它也常被不法商人用作食品添加剂, 以提升食品检测中的蛋白质含量指标, 因此三聚氰胺也称为“蛋白精”^[2]。

1.3 三聚氰胺的应用 三聚氰胺常用于生产塑料、胶水和阻燃剂。主要用来制作三聚氰胺树脂。它具有优良的耐水性、耐热性、耐电弧性、耐老化, 同时具有优良的阻燃性。被广泛用于装饰材料的

制作, 是塑料、涂料、币纸增强剂、纺织助剂、厨房用具、防火纤维、商业滤膜、胶水和阻燃剂, 此外还可用于皮革鞣制、脱漆剂以及制造化肥等。

2 三聚氰胺的毒性研究

林祥梅^[3]对三聚氰胺的细胞毒性、急性毒性和亚慢性毒性进行了研究, 并客观评价了动物长时间接触该化合物的危害性。提示实验动物存在肾衰竭的可能, 动物饲喂三聚氰胺后肾小管中出现晶体, 人过量食用三聚氰胺亦会发生肾衰竭甚至死亡。

2.1 三聚氰胺对 BHK 细胞的毒性试验 不同浓度的样品对 BHK 细胞作用 24 h 后, MTT 法测定 A570, 计算细胞的存活率, 统计分析结果表明, 发现高浓度可大量抑制细胞成活。三聚氰胺在高浓度时 ($\geq 1.667 mg/mL$) 与细胞存活率显著相关 ($P < 0.05$), 计算 IC_{50} 为 $10.11 mg/mL$ 。

2.2 三聚氰胺的急性毒性试验 实验结果表明最高剂量 ($20\ 000 mg/kg$) 组给药后 9 h, 小鼠开始出现不安, 呼吸急促, 随后在几十分钟内死亡。其他剂量组小鼠仅见精神不振, 反应迟钝, 闭眼伏卧, 不食等症状, 随后在 24~48 h 出现个别死亡。灌胃死亡的小鼠输尿管中均有大量晶体蓄积, 部分小鼠肾脏被膜有一层晶体。其他脏器未见明显的变化。

2.3 三聚氰胺的亚慢性毒性试验 当猫的饲料中添加三聚氰胺后, 血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (CRE) 逐渐升高, 23 d 这两项指标超过正常范围 (BUN: $5.4 \sim 13.6 mmol/L$, CRE: $62 \sim 190 \mu mol/L$)。猫在饲喂三聚氰胺 30 d 后, 肾脏中可见淋巴细胞浸润, 肾小管管腔中出现晶体。由此推断三聚氰胺长期饲喂可能引起肾衰竭, 其损伤机制还需要进一步研究。

3 饲料中三聚氰胺的检测

三聚氰胺(高含量: $\geq 98\%$)的传统测量方法是间接测定,往往是在测定其它杂质如水分、灰分、碱溶物后以差减方法求得其含量。近年来开始采用直接的测试方法:如升华法、重量法等。但这些方法的缺点是操作繁琐,分析时间长,测定低含量三聚氰胺时误差大^[4]。现在介绍几种现阶段检测饲料中三聚氰胺的简便、灵敏、快速的方法。

3.1 高效液相色谱法(HPLC-MS) 倪沁颜^[5]采用 SymmetryC18 柱为分离柱,二极管阵列紫外检测器进行样品检测($\lambda_{\max}=236\text{ nm}$)。其方法简单、快速、重现性好,平均回收率大于 90%,RSD 小于 3.0%,线性范围为 1~100 mg/L。该法同国标所定的重量法相比,操作简便、灵敏、检测线性范围宽,具有较强的实用性。

赖碧清等^[1]运用 Agilent HP1100 高效液相色谱-四极杆质谱联用仪,优化质谱条件,建立了饲料中三聚氰胺残留检测方法,并进行了验证。结果表明该方法用于测定动物尿液中的三聚氰胺残留量,相对标准偏差在 3.2%~7.7%之间,回收率在 72.4%~91.2%之间,具有较好的准确度和精密度。

黄芳^[6]建立了饲料中三聚氰胺的高效液相色谱-质谱测定方法。色谱条件: Kromasil C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:乙腈-0.1%(体积分数)甲酸(体积比 5:95),流速 0.4 mL/min。采用正离子模式的电喷雾质谱检测,以一级质谱得到的准分子离子 m/z 127 作为母离子,进行碰撞诱导解离(CID)二级质谱(MS2)分析,选择母离子和 MS2 的碎片离子 m/z 85、109 定性确证,提取 m/z 85、109、127 三个离子质量色谱峰面积定量。实验优化了质谱条件。线性范围为 0.01~0.5 mg/L,检出限 0.01 mg/L(S/N=3),回收率为 80%~99%。

3.2 气象色谱-质谱法(GS-MS) 王征^[7]采用 GC-MS 法测定动物食品中的三聚氰胺,通过甲醇/水/三乙胺混合液提取动物食品中的三聚氰胺,氮气吹干、硅烷化衍生,再由气相色谱-质谱联用仪检测,苯代三聚氰胺内标法定量。该方法在饲料和动物食品中三聚氰胺的加标回收率在 82.0%~105.6%之间,相对标准偏差(RSD)不大于 5.8%,在 0.1~50.0 mg/L 范围内呈现良好的线性关系且灵敏度高,最低检测限达到 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。它具有选择性好,能有效消除复杂基质干扰的优点。因此,本

方法适用于动物食品中三聚氰胺类有机物含量的常规检测。

3.3 固相萃取-液相色谱-串联质谱法 刘梅^[8]等采用该法对食品中三聚氰胺的含量进行测定。样品经均质,1%三氯乙酸溶液提取,用 OASISMCX 固相萃取小柱净化,减压浓缩后以甲醇溶解定容,用 Waters BEH-C8 柱分离,乙腈和水为流动相,经液相色谱-串联质谱法检测。串联质谱 MRM 采集方式的高选择性使得方法的准确度更高,同时采用 Waters BEH-C8 色谱柱使目标物和杂质得到较好的分离。用该法测定食品中三聚氰胺含量,准确可靠,重复性好,灵敏度高,满足出口食品检测的需要。

3.4 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法(UPLC-SEI-MS/MS) 蔡勤仁^[2]等采用 UPLC 检测饲料样品中三聚氰胺的含量。样品经 1%三氯乙酸-二甲基亚砷提取,Waters OasisMCX 柱净化,超高效液相色谱分离,最终采用电喷雾串联四极杆质谱进行检测。结果表明,三聚氰胺在饲料中的含量范围为 10~5 000 $\mu\text{g/kg}$ 时,线性关系良好($r>0.99$)。在 10~100 $\mu\text{g/kg}$ 的添加水平范围内的平均回收率为 83%~94%,相对标准偏差为 4.2%~6.5%,检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法具有特异性强、前处理简单、重复性好等特点,与传统的 HPLC 分离方法比较,分析时间大大缩短,定量下限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法非常适合饲料中三聚氰胺的快速检测。

3.5 反相高效液相色谱法 王亚吨^[9]等采用反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量,预先经 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化的 Strata-X-C 柱,再用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤固相萃取柱,抽干后用 3 mL 氨水甲醇溶液洗脱,50℃氮气吹干,准确加入 2.0 mL 甲醇溶液,旋涡振荡 1 min,过 0.45 μm 滤膜后上机测定。该研究优化了高效液相色谱方法测定饲料中三聚氰胺的色谱分离条件。线性关系良好,有较高的回收率和较好的精密度,饲料中杂质峰对三聚氰胺出峰干扰少,方法简单,易于操作,准确度与精密度符合要求,可用于配合饲料中三聚氰胺的检测。

3.6 近红外线吸收检测技术 据胡阶明^[10]报道, Spectra-Quad 采用近红外线吸收检测技术,是一种无接触、无损伤和无危害的检测方法。传感器利用特定波长的近红外线照射样品,并对反射光线

(下转第 18 页)

中草药防治奶牛乳房炎的研究进展

龚平阳¹, 肖兵南², 戴强¹

(1. 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131)

中图分类号: S858.23

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0009-03

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最常见的疾病之一,它不仅影响奶牛产奶量,造成严重的经济损失,而且影响牛奶的品质。乳房炎病牛乳汁中的大量病原微生物及其产生的毒素或经治疗后产生的大量抗生素残留,可直接危害人类健康。目前,全世界约有2.2亿头奶牛,其中约有1/3的奶牛患有各种类型乳房炎,每年因乳房炎造成的损失高达350亿美元。仅美国的损失就达20亿美元;在芬兰、挪威、瑞典,因患乳房炎而被淘汰的奶牛分别占35%、19%、和22%;而我国奶牛乳房炎的发生率更高,每年因乳房炎造成的损失约达1.35亿元人民币。多年来,国内外专家对奶牛乳房炎的防治进行了广泛深入的研究,使用化学药品和抗生素防治奶牛乳房炎也取得了一定的效果。但是,由于耐药菌株的产生和抗生素问题的出现,使其治疗效果不佳,同时还危害到人类的健康。随着人们对食品安全要求的不断提高,生产无抗乳已成为畜牧兽医工作者研究的重要课题之一。中草药是纯天然物质,含有多种有效的生物成分,具有抗菌消炎、不易产生耐药性等特点。利用中草药防治奶牛乳房炎已为国内外专家所关注。现将中草药防治奶牛乳房炎的研究进展概述如下:

1 奶牛乳房炎的发病原因

奶牛乳房炎是其乳腺受到微生物感染、外伤或化学刺激而引起的一种炎性反应,由病原微生物引起的乳房炎称传染性乳房炎。导致乳房炎的病原微生物很多,常见的有葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌,偶尔可见牛支原体、某些酵母菌、支原体、克雷伯氏菌、绿脓杆菌、牛棒状杆菌、真菌等。非传染性乳房炎包括乳腺组织的外伤,或由于不当的药物灌注处理对乳腺组织产生刺激,以及挤奶设备功能异常引起的乳腺炎症。

中兽医学认为,乳房炎即奶肿、奶黄、乳痈,是痰、湿、气、血郁结不散,化而为炎,与肝胃两经有

关。因饲养管理不善,久卧湿热之地,湿热毒气上蒸,侵害乳房;或因胃热壅盛,肝郁气滞,乳络失畅以致乳房气血凝滞,瘀结而生痈肿;或因牛犊吸乳时咬伤乳头,邪毒入侵引起痈肿;或患牛拒绝挤奶,使乳汁停滞,乳房胀满等原因而导致本病。此外,应用激素治疗奶牛生殖系统疾病时,因其正常激素分泌被扰乱,也可引发乳房炎。

2 中草药防治奶牛乳房炎的作用机理

2.1 增强免疫机能 资料表明近200种中草药具有免疫活性。其有效活性成分主要为多糖、甙类、生物碱、挥发性成分和有机酸等。在患隐性乳房炎的奶牛精料中添加中草药(当归、川芎、芍药等)能明显改善牛的白细胞免疫机能^[1]。王秋芳等^[2]用自拟中草药复方治疗奶牛乳房炎,发现试验组中性粒细胞吞噬率显著高于对照组。

2.2 改善内分泌,调节泌乳功能 金允燮等^[3]应用当归、川芎、穿山甲、王不留行、白芷等在泌乳高峰期对泌乳量没有明显影响,但在泌乳量下降期能明显提高泌乳量,表明中草药添加剂对乳腺的功能退化具有明显的抑制作用。张庆茹等^[4]试验表明,中草药饲料添加剂(党参、白术、黄芪、当归等)可以显著提高奶牛血清甲状腺素、催乳素和生长激素含量。

2.3 抗炎作用 奶牛乳房炎的主要临床症状是炎性反应,它是引起乳腺损伤和产奶量下降的直接原因。所以治疗乳房炎首先要注重炎症的消散。中草药具有不同程度的抗炎作用。王天治等^[5]报道,金银花可明显抑制鹿角菜胶所致的大鼠足跖水肿和巴豆油性肉芽囊大鼠的炎性渗出和增生。张炜等^[6]和延卫东等^[7]的研究表明,连翘和黄芩可明显抑制炎性渗出和水肿,但不影响组织修复增生;张继瑜等^[8]用中药乳源康对老鼠进行抗炎试验,结果显示乳源康注射剂和氢化可的松组与对照组相比较差异显著($P < 0.05$),具有良好的抗炎作用;王新等^[9]

试验研究表明金银花、连翘、蒲公英、鱼腥草和黄芩对急、慢性炎症都有一定的抗炎作用。

2.4 抑菌抗菌作用 抑菌抗菌是防止和治疗奶牛乳房炎的关键。近年的研究表明,许多中草药都有一定的抑菌抗菌作用。徐忠赞等^[10]研究表明,六苈素对奶牛无乳链球菌、金葡萄球菌等都有较强的抑制作用;杜爱芳等^[11]测定发现,合成鱼腥草注射液对引起乳房炎的常见菌有一定的抑菌效果;牛新华等^[12]用连翘浸出液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、己型溶血性链球菌抑菌作用进行了研究。结果表明,连翘对以上细菌均有明显抑菌作用;吴国娟等^[13]用 8 味中草药及其复方对奶牛常见的 6 种菌进行了抑菌试验,结果表明,瓜蒌、金银花的作用最强;许丹宁等^[14]分别以蒲公英、金银花、连翘、穿山甲、王不留行为主药,其他一些中草药为配药组成 3 个复方进行抑菌试验。结果表明,3 个中药方剂对主要致病菌均有不同程度的抑制作用;王雄清等^[15]测定了黄芩、黄柏、黄连、大黄、金银花、秦皮、板蓝根、丹参、诃子、石榴皮对奶牛 6 种乳房炎病原菌的体外抑菌效果和最低抑菌浓度。结果表明,黄芩、黄柏、黄连、丹参、石榴

皮对 6 种奶牛乳房炎病原菌均有明显的抑菌作用。

3 中草药治疗奶牛乳房炎的特点

3.1 辨证施治 根据乳房炎的发病机理和中药药理学理论,以清热解毒、抗菌消炎、通经活血、消肿止痛、活络通乳为原则,补气升阳、扶正祛邪,从而保持机体内环境的动态平衡,达到防治目的。

3.2 标本兼治 中草药可直接或通过提高机体的免疫力间接抑制或杀灭乳房炎的病原菌,同时中草药又具有解热、镇痛、抗炎等作用,可达到标本兼治的效果。

3.3 毒副作用小 中草药的有效成分大多为生物有机物,相对抗生素和化学合成药物毒副作用小。

3.4 不易产生耐药性 目前所用的抗生素和化学合成药物均有产生抗药性的弊端,而中药独特的抗菌作用机理,不易产生耐药性,可长期添加使用。

4 中草药在防治奶牛乳房炎上的应用

由于中草药具有资源来源广泛,有效成分含量丰富,高效低毒,不易产生抗药性及药物残留等优点,所以近些年来,许多专家对中草药及中西结合防治奶牛乳房炎进行了深入的研究,且取得了不错的效果。如表 1。

表 1 中草药在防治奶牛乳房炎上的应用

作者	时间	用药	结果
刘纯传等 ^[16]	1983	复方蒲公英煎剂内服治临床乳房炎 126 例	治愈率 94.44%,病原菌转阴率 40%
杨致礼等	1988	用紫花地丁、黄花地丁、青皮、地勺、木鳖子作成混合针剂采用乳池注射,乳房涂擦和生理盐水冲洗乳池,肌注三种方法对 20 头奶牛进行治疗	总有效率分别为 40%,88.8%,80%
张运海等	1990	在泌乳早期加入中草药添加剂(含党生、当归等 12 味药)	明显提高产乳量,乳汁质量,降低了乳房炎发病率
秦俊文等	1997	以金银花、蒲公英、紫花地丁、柴胡等 24 味中药制成的“乳炎平”散剂治疗临床型乳房炎	有效率为 85%
张彬等 ^[17]	2000	用消炎酞治疗奶牛乳腺炎 125 例	治愈 105 例,治愈率达 84%
冯丽荣等 ^[18]	2000	取乳房消肿散(主要成分为金银花、蒲公英、川芎、当归、连翘等)灌服与特效米先肌注联合用药	153 例中,有效为 140 例,有效率为 91.5%;治愈 131 例,治愈率为 85.6%
杨存良等 ^[19]	2002	用藕节汤(藕节、瓜蒌、牛蒡子为主药)灌服治疗急性乳房炎	26 例急性乳房炎奶牛,用药 2~3 d 全部痊愈
木村直美等 ^[20]	2003	复方黄连(黄连、蜂胶、乳香)和复方大青叶(大青叶、五倍子、乳香)2 个处方分别制成的中药乳头浸蘸剂治疗隐性乳房炎	与对照组相比,隐性乳房炎阴性率为 53.6%,63.9%($P < 0.01$)
丁月云等 ^[21]	2004	选择连翘、金银花、黄芩、黄柏、鱼腥草等 21 种中草药进行抑菌试验	发现诃子、黄芩、石榴皮等的综合效果最好
许谨等	2004	用乳安注射液(含绿原酸和黄芪多糖)治疗奶牛乳房炎	治愈率为 86.7%
罗伟等 ^[22]	2005	研制“乳炎康”(主要由蒲公英、夏枯草、柴胡、鱼腥草等组成),对奶牛乳房炎进行临床治疗试验,	用药 2~3 d 后,有效率为 94.2%
张继东等 ^[23]	2006	以蒲公英、连翘、地榆、丹参等 8 味药组成方剂,制成透皮剂和乳头灌注剂对患临床乳房炎和隐性乳房炎奶牛 30 头进行用药	5 天后试验牛乳汁理化性质恢复正常
周绪正等 ^[24]	2007	中草药制剂“乳源康”治疗组各类型临床乳房炎病牛 1638 头次,2203 个乳区	治愈率为 93.3%,总有效率为 96.7%
张敬礼等 ^[25]	2007	自拟中草药方剂(红花、黄连、黄芩、蒲公英、金银花、当归、王不留行)治疗奶牛隐性乳房炎	连续用药 15 d 后有效率 100%,治愈率 83.3%以上,并有明显的增乳作用
张乃峰等	2007	奶牛在精料中添加中草药饲料添加剂(含忍冬藤、蒲公英、川断等)代替抗生素	奶牛乳房炎阳性率由 41.48%降至 3.13%,总有效率达到 92.45%($P < 0.05$)

5 中草药防治乳房炎存在的问题

5.1 作用机理不完全清楚 实验表明中草药作用广泛,即能抗炎、抑菌抗菌,又能调节机体免疫功能,还能加强新陈代谢,但是由于中草药成分极其复杂,给研究带来很大的困难,所以中草药的具体作用机理包括作用途径、靶点等都还不完全清楚。

5.2 剂型不够合理,生产工艺落后 中草药防治奶牛乳房炎的剂型多停留在散剂、煎剂等剂型。生产工艺落后,产品科技含量低,有效成分含量不高,散剂用量大,给生产和运输,用药都带来不便。

5.3 毒副作用缺乏研究 许多研究证实,中草药确实有毒性,但经过加工、炮制可降低或减弱其毒性。就目前中草药添加剂的加工及检测技术,尚难将这些有毒成分完全分离去除。同时对中草药的残留量,耐药性以及添加到饲料中后是否对饲料本身的成分产生影响都缺乏深入的研究。

5.4 产品质量不稳定 中草药由于品种不同、产地不同、采摘时间不同,有效成分及其含量差异很大,加上中草药成分复杂,难以用终端控制的方法保证其产品质量。同时目前我国还缺乏科学规范的质量标准来控制产品的质量。

6 中草药防治奶牛乳房炎的展望

中草药作为一种防治奶牛乳房炎的纯天然药物具有其本身天生的优势,但中草药产品要想在激烈竞争的国际市场中占有一席之地,甚至取代其他抗生素成为防治乳房炎的主要产品,先决条件必须是实现兽用中草药现代化^[26]。具体说来就是应用现代化科学技术研究体系,包括现代生物科学、化学、物理学、信息科学等对兽用中草药作用机理、中草药基本理论进行基础性研究,使其安全性、有效性得到客观量化;应用现代高新技术手段替代传统生产工艺,提高生产效率及产品质量。同时大力开展中草药制剂剂型的研究,根据现代制药技术和方法开发中草药注射剂、透皮剂、穴位埋置剂、免疫增强剂等不同剂型,研制出适合兽医临床应用的剂型。

中草药作为纯天然的绿色产品,在防治奶牛乳房炎上具有广阔的应用前景。虽尚有许多困难,但随着科学技术的发展和对中草药的深入研究,中草药必将发挥越来越重要的作用。

参考文献:

[1] 张淼涛,丛日华,张文龙,等. 中药对奶牛隐性乳房炎的防治作用及对产奶量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (1): 20-21.

- [2] 王秋芳,张淼涛,效梅,等. 中药对隐性乳房炎奶牛细胞免疫功能的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 23(4): 408-411.
- [3] 金允燮,刘学龙,金清洙,等. 中草药添加剂对奶牛乳腺发育的影响[J]. 延边大学农学学报, 1998, 20(4): 281-283.
- [4] 张庆茹,李建国,李新民,等. 中药饲料添加剂对奶牛内分泌机能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医 2005, (4): 54-55.
- [5] 王天治,李永梅. 金银花的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(4): 292-298.
- [6] 张炜,张汉民,郭美丽. 连翘的药理学研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 7-10.
- [7] 延卫东,王瑞君,何琰,等. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2002, 23(12): 1127-1129.
- [8] 张继瑜,胡俊杰,李建勇,等. 中药“乳源康”药理作用研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(2): 77-79.
- [9] 王新,张秀英. 9种中药抗炎作用的实验观察[J]. 中兽医学杂志, 1994(9): 31-32.
- [10] 徐忠赞,郁杰,李金善,等. 六茜素治疗奶牛临床乳房炎的疗效观察[J]. 中兽医学杂志, 1994(9): 31-32.
- [11] 杜爱芳,蔡渭明,胡松华. 合成鱼腥草素对奶牛乳房炎致病菌的抑制作用[J]. 中国兽医科技, 1997(3): 37-38.
- [12] 牛新华,邱世翠. 时珍国医国药[J]. 2002, 6(3): 342-343.
- [13] 吴国娟,张中文,李焕荣,等. 中草药对奶牛乳房炎6种致病菌的抑菌效果观察[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(3): 195-198.
- [14] 许丹宁,侯振中,薛岩. 3个中药方剂对奶牛乳房炎病原菌的体外抑菌效果[J]. 中国兽医杂志, 2006, (11): 34-35.
- [15] 王雄清,代敏,罗英,等. 10种中药对奶牛乳房炎病原菌的体外抑菌试验[J]. 绵阳师范学院学报, 2006, 2(4): 52-55.
- [16] 刘纯传,庄自新,张礼华,等. 应用中药治疗奶牛临床型乳房炎的研究初报[J]. 中兽医医药杂志, 1983, (3): 2-6.
- [17] 张彬,薛明,崔颖,等. 用新兽药消炎醒对奶牛乳腺炎临床治疗试验[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(8): 28-29.
- [18] 冯丽荣,马树东. 中西兽药配合治疗奶牛临床型乳房炎疗效观察[J]. 黑龙江畜牧科技, 2000, 1(1): 25-26.
- [19] 杨存良. 自拟藕节汤治疗奶牛急性乳房炎[J]. 中兽医学杂志, 2000, (1): 32.
- [20] 木村直美,张克家,陆钢. 中药乳头浸蘸剂防治奶牛隐性乳房炎的研究[J]. 国兽医杂志, 2003, 39(10): 29-32.
- [21] 丁月云,李茜,王恬. 21种中药对奶牛乳房炎3种病原菌的体外抑菌试验[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(12): 5-7.
- [22] 罗伟,胡勇. 纯中药制剂“乳炎康”对奶牛乳房炎的治疗试验[J]. 河北畜牧兽医, 2005, 21(2): 38-39.
- [23] 张继东,李淑芳,苑方重,等. 奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定和中药防治试验[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(11): 32-33.
- [24] 张敬礼,王双山. 自拟中草药方剂治疗奶牛隐性乳房炎的试验[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 6(2): 67-68.
- [25] 周绪正,张继瑜,李剑勇,等. “乳源康”对奶牛乳房炎的疗效研究[J]. 动物医学进展, 2007, 28(2): 44.
- [26] 梁剑平,张应禄,李滋睿,等. 兽用中草药研究开发展望[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 4(4) 21-23.

影响小规模猪场正常发展的主要原因分析与改进措施

吴同山¹, 李旭金², 陈日秀¹

(1. 东莞市畜牧科学研究所, 广东 东莞 523086; 2. 东莞市动物卫生监督所东城分所, 广东 东莞 523110)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0012-02

随着我国经济的不断发展和部分地区产业结构的调整, 经济发达地区不再养猪而偏远地区养猪规模越来越大、数量越来越多的局势将越来越清晰, 加上外资强势加入到国内养猪行业中, 大型规模化猪场不断增多, 一定程度上限制了农村小规模猪场的发展。但是, 由于我国的国情和农村的现状, 决定了农村小规模猪场将长期存在, 并且数量巨大。据统计, 到2007年末, 小规模饲养场户生猪存栏量仍占全国总存栏猪只数量的50%, 对养猪业的发展仍起着不可或缺的重要作用。然而, 很多小规模猪场的生产不正常, 母猪配种受胎率低、头均母猪年上市猪只数量少(少的每头母猪年上市猪只12~14头)、成活率低等问题突出, 直接影响到经济效益。针对小规模猪场存在的直接影响生产成绩的一些问题简单分析如下, 同时提出改进建议, 期望能对大家有所帮助。

本文中小规模猪场是指饲养母猪300头以下或饲养商品猪500头以下的猪场。

1 小规模饲养场户购买饲养纯种母猪

很多自繁自养的小规模猪场有几十头甚至两、三百头种猪(瘦肉型或土杂种猪), 为了节约成本, 不想从其它种猪场引进种猪, 根据本场种猪存栏的数量和需要更新的比例, 有的购买1~2头纯种长白或大白母猪, 有的购买10头左右, 由于本场没有纯种公猪, 无法进行杂交, 就通过购买外场公猪精液或请专门赶公猪配种的场户进来配种, 产出来的小母猪自己留下来做种猪, 以补充淘汰的种猪。

从表面上看, 这种做法节约了引进种猪的成本, 其实得不偿失: 规模太小, 不可能引进太多的纯种母猪, 按每头母猪每年生产20头种猪计, 最后成活也就是17~18头, 按正常的每窝有50%的母猪计算, 最多也就是8~9头母猪, 除掉体型、乳头、外阴等不正常的, 每头纯种母猪年提供小母猪6~7

头, 剩余的猪只价值就比较低, 没有明显的利润; 利用外来的公猪来配种, 容易带来疾病, 不安全; 不引进外血, 本身母猪繁殖性能容易退化, 直接影响生产成绩。

为了保持正常的生产和获得更大的经济效益, 小规模饲养场户没必要饲养纯种母猪, 根据正常情况下20%~25%的更新率, 每年应定期到正规种猪场引进一批后备种猪进行补充。

2 商品猪留作种猪

在市场行情不断看涨、猪价不断上升的情况下, 由于种猪比较紧俏或价格比较高, 如2007年底到2008年初, 二元杂母猪售价为2500~2800元。需要补充母猪时, 很多小规模猪场就将本场繁育的三元杂商品母猪选留做为母猪进行繁殖; 一些非正规的种猪场, 也趁机把一些三元杂商品猪冒充种猪卖给不识货或对购种猪有急切心理的客户。这些猪只的繁殖能力没有太大问题, 但其后代与真正的三元杂商品猪相比, 表现为生长速度慢、饲料报酬低, 行情好的时候差别不明显, 行情低迷时影响就很大。

只要生产正常, 一头淘汰母猪的价格基本上可以购买一头种猪, 因此没必要把商品猪留作种猪。

3 过度延长母猪使用时间

为了节约成本, 小规模猪场的生产母猪一般利用时间均比较长。据了解, 存栏10胎以上的母猪是比较常见的。甚至有些个体户的母猪已经产了14胎, 断奶后还在配种。

众所周知, 我国地方品种猪的使用年限是比较长的, 特别是在农村, 只要能生产就留下来; 瘦肉型种猪一般最佳使用胎次到第8胎(使用3.5年或出生后4年左右), 以后胎次的猪, 母猪哺乳能力降低、商品猪生长速度慢、饲料报酬低、病多、瘦弱、难饲养、成活率低。胎次越大, 这种特点越显著, 对猪场的正常生产非常不利。

参考大型养猪企业的做法,生产母猪生产到第8胎就应淘汰,以保证母猪群体处于最佳生产状态。

4 后备母猪配种过早

为了创造更多的效益,一些小规模饲养场户在后备母猪6个月龄或85~90 kg时一发情就开始配种。殊不知,这个时候瘦肉型种猪性成熟了,表现出了正常的性欲,但还没有达到体成熟,过早配种使用,容易造成难产、产后发情困难、哺乳能力差等,从而增加了淘汰率。

正确的做法是:体重达100 kg前自由采食,100 kg后根据体况限制饲喂,怀孕料2~2.5 kg/天;加强运动,试情公猪或发情母猪诱情;观察记录初情期,在8月龄左右110~120 kg时,第二或三情期开始配种,出现站立反应后开始用公猪直配或输精,后隔8~12 h再重复直配或输精,输精时间控制在5~10 min/次;配种15天前要完成乙脑、细小病毒、猪瘟、伪狂犬、口蹄疫等疫苗注射。

5 母猪无效饲养时间长

有的母猪长期不发情甚至一年没有产过小猪;有的母猪到分娩时才知道没有怀孕;有的母猪长期发病但久治不愈;有的母猪连续5~6个情期返情又配种但屡配不孕;有的母猪连续几胎产仔8头以下。猪场为了保持猪群的数量而不淘汰,无形中延长了种猪的无效饲养时间(正常情况下,一般母猪年产2.2~2.4胎),浪费了大量的饲料,从而减少了应得的利润。

在保持20%~30%的正常更新范围基础上,对于那些屡配不孕、久不发情、瘦弱多病、连续多胎小胎及其他没有使用价值的母猪,要及时淘汰,尽量减少无效饲养时间。

6 长期不检查公猪精液品质

小规模猪场由于条件所限,大部分母猪采用自然交配的方式配种。进行自然交配的公猪,大部分常年没有检查过一次精液品质,只有等到与配的母猪大部分返情后才知道精液品质不行,浪费了大量精力。

其实,即使用于自然交配的公猪,每个月也要坚持检查一次精液品质,检查精液中精子密度、精子活力,以保证与配母猪的受胎率。具体做法是:在公猪自然交配时,用内层套有食品保鲜袋的一次性纸杯或小茶杯接一些精液,自行进行检查或送当地兽医站检查,并做好记录,以备以后查用。

7 防疫工作混乱

很多小规模猪场的经营管理者,防疫意识不强,虽然近两年猪病比较多,但很多猪场也只是随大流地跟着其它猪场进行防疫工作,别人注射蓝耳病疫苗自己也跟着注射,别人注射喘气苗自己也注射,而常规的也是最基本的防疫如猪瘟、伪狂犬、口蹄疫等却没有一个正规或科学的免疫程序,多数是凭借自己的感觉或猪只发病后才做,侥幸心理严重,猪只的抗体水平较低,抗疾病能力差。

不论猪场规模大小,也不论饲养的是种猪还是肉猪,每个猪场都要有符合自己实际情况的科学且可行的免疫程序,并且在操作时不能偷工减料,不要少注、漏注或错注疫苗。

8 饲料更换频繁,质量无保证

很多小规模猪场的经营管理者,由于过分注重低成本,无论什么饲料,只要有厂家上门推销并且价格比自己正在使用的便宜,都喜欢盲目地追求实用,其实这也正好适合小饲料厂家的需要,但效果就难说了;有的猪场不是所有者自己经营打理,主要靠亲戚或技术人员,可能哪个厂家给的回扣高就换那家的饲料,至于猪养得好不好,那是次要的。经常变换饲料,有时饲喂后效果好的也没有坚持使用,质量忽好忽坏,有时猪只刚适应一种饲料,很快又被换掉了,对猪只的生长非常不利。

对于饲料的使用,应坚持质量第一的原则,选饲料厂家时,要选声誉好、规模大、质量有保证、售后服务完善的厂家。开始时,可以通过对比试验,确定用效果好的饲料,并坚持使用,遇到因饲料原因引起的问题时,及时与厂家沟通,必要时再选其它正规厂家的饲料。

9 猪只缺乏常规保健

小规模饲养场户,多注重眼前利益,猪只出现问题时,让他用多贵的药物或保健品都可以,但猪场一稳定,这些就丢到脑后了,如常规的驱虫工作、饲料中长期添加柠檬酸、饲料中添加中草药等,对猪只保健及预防疾病都有好处。但很难坚持下去。

猪只常规保健工作做得好与坏,直接影响到猪只的生长,一定不能忽视,并且还要长期坚持。

小规模猪场,由于缺乏专业的技术人员现场操作,要特别重视以上的问题,只要认真落实各项措施,细心管理,一定会使自己的猪场走上规范化生产的道路,并顺利达到自己的经济目标。

波尔山羊与本地白山羊杂交改良试验

刘东军

(新疆石河子148团农业科, 新疆 石河子 832048)

中图分类号: S813.22

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0014-02

我区饲养的新疆山羊个体较小, 生长速度较慢, 屠宰率低。2005年以来开展了引进外来品种杂交改良本地山羊的试验, 通过几年的改良杂交试验, 波尔山羊与本地山羊杂交后代的出生重, 生长速度等几项指标得到较大提高, 经济效益明显。

1 试验羊群饲养标准

1.1 妊娠母羊饲养标准 见表1。

1.2 哺乳羔羊饲养标准 指出生至3月龄阶段。见表2。

表2 羔羊饲养标准

单位: 只/日

体重(kg)	风干饲料(kg)	代谢能(Mcal)	粗蛋白(g)	钙(g)	磷(g)	食盐(g)
4	0.12	0.45	62	0.96	0.50	0.60
6	0.13	0.8	62	1.0	0.50	0.60
8	0.16	0.94	74	1.3	0.70	0.70
10	0.24	1.10	87	1.4	0.75	1.1
12	0.32	1.20	90	1.5	0.80	1.3
14	0.4	1.40	91	1.8	1.2	1.7
16	0.48	1.70	92	2.2	1.5	2.0

1.3 育肥羔羊饲养标准 见表3。各羊群保持中等营养水平, 若低于中等膘情应在饲养标准基础上增加20%~30%。

表3 育肥羊饲养标准

单位: 只/日

月龄	体重(kg)	日增重(kg)	风干饲料(kg)	代谢能(Mcal)	粗蛋白(g)	钙(g)	磷(g)	食盐(g)
3	23	0.12~0.18	1.2	2.8	167	2.0	1.0	5.0
4	28	0.12~0.18	1.4	3.2	217	3.0	2.0	5.8
5	35	0.12~0.18	1.7	3.6	233	4.0	3.0	7.0
6	40	0.12~0.18	1.9	4.1	250	7.0	4.7	7.5

2 材料与方法

2.1 种公羊 为上海引进的两周岁波尔山羊6只, 体重平均56.5 kg, 饲养标准按种公羊饲养标准, 每吨精料添加种维生素添加剂150 g、氯化胆碱500 g。采精配种期间添加鱼粉5~8 g/kg, 每日添加胡萝卜300 g/只。种公羊饲料中不能使用棉粕, 以免棉粕中的棉酚影响公羊的生殖机能。

2.2 试验母羊 选择本地山羊60只, 平均体重34.7 kg, 随机分成两组, 打耳号, 记录档案。试验前口服丙硫苯咪唑15 mg/kg, 皮下注射伊维菌素注射液0.02 mL/kg。驱虫两次, 驱虫后一个月开始试验。

2.3 试验时间 从2005年开始, 到2007年11月结束。

2.4 试验地点 2005年在我团育肥羊场, 育肥羊场圈舍为砖混结构, 苯板轻型屋面。圈舍总面积

表1 妊娠母羊饲养标准

单位: 只/日

项目	体重(kg)	风干饲料(kg)	代谢能(Mcal)	粗蛋白(g)	钙(g)	磷(g)	食盐(g)
妊娠前期	30	1.3	1.8~2.3	110~130	2.8	1.8	6.0
	40	1.6	2.2~2.5	116~140	3.0	2.0	6.6
	50	1.8	2.7~3.0	124~150	3.2	2.5	7.5
妊娠后期	30	1.6	2.8	141~160	6.0	3.8	7.0
	40	1.9	3.4	147~190	7.5	4.3	7.9
	50	2.0	3.9	184~200	8.0	4.6	8.3
泌乳母羊	30	2.0	2.5~5.1	120~250	7.0	4.3	8.3
	40	2.2	3.0~5.5	125~280	7.5	4.7	9.1
	50	2.4	3.2~5.7	130~300	8.0	5.1	9.9

750m²。2007年一部分实验母羊在我团一些养殖专业户圈舍中饲养。

3 采用人工授精技术

3.1 测定精液品质:包括射精量、精子密度、活力、畸形率,活力进行5级品质评定,低于4级和畸形精子率大于20%者弃去不用。

3.2 鲜精稀释液用葡萄糖、柠檬酸钠配制,高压灭菌分装备用。

3.3 鲜精40倍稀释时,精子活力保持时间较长,保存温度4.0℃,8~12h内测定活力,活力0.45~0.5可用。

3.4 采用阴道深部配种,每只发情母羊配两次。

输精前用0.03%新洁而灭溶液清洗母羊外阴,用纸巾擦干。输精器械注意高压灭菌消毒,以免影响育种效果。

3.5 繁殖结果:60只试验羊的受胎率89.2%,产羔112只,繁殖率185%。两组在受胎率、繁殖率上差异不显著。如果母羊饲料中使用棉粕,为防止棉粕中的棉酚营养母羊的繁殖机能,饲料中棉粕的用量不能超过180g/kg,饲料保证足够的维生素和微量元素,特别是维生素A、维生素E和硫酸亚铁。

4 杂交改良结果

波尔山羊与本地山羊杂交和本地山羊后代的出生重,在1、2、3、6月龄进行称重分析。见表4。

表4 杂交改良结果

		单位:kg				
项目	性别	出生重	1月龄	2月龄	3月龄	6月龄
波×本	公	2.71±0.42	7.10±1.02	15.30±2.70	21.47±2.00	36.10±1.05
	母	2.94±0.58	7.25±1.16	15.10±2.50	21.30±1.98	35.37±1.17
本地山羊	公	1.89±0.35	4.15±0.7	8.31±1.12	10.81±1.08	17.17±1.85
	母	1.86±0.41	4.10±0.56	8.29±1.15	10.36±1.90	17.10±1.14

5 小结与讨论

杂交一代羔羊是典型的肉羊体形,个体结实,体躯匀称,四肢粗壮,被毛短,羔羊生长速度快,后躯发育好,肌肉丰满,对舍饲的适应性优于地方品种,杂交优势十分明显。

5.1 随着月龄的增大,上述两实验组的差异增大。说明杂交羊后期生长旺盛,饲料报酬高,经济效益明显。杂交一代在3月龄后生长速度较快,生产中注意日粮的供给,以满足生长发育的需要。

5.2 生产母羊后期体况明显下降,所用的饲料标准有待进一步提高,特别是泌乳母羊的饲料标准要提高。羔羊体质较弱,生长速度较慢的母羊可以在日粮中添加甜菜,增加饲喂多汁饲料,以增加母羊的产奶量。

5.3 在实验过程中,羔羊的成活率不高,主要是由于哺乳母羊管理不当所致。后期通过加强补饲和对羔羊的饲养管理,补充铁、铜、V_A、V_{B3}、V_E,生长情况较好,成活率较高。羔羊饲养管理中注意使用代乳料,代乳料中的非乳成份特别是植物性成份中的纤维素,可以促进羔羊瘤胃的发育。

5.4 羔羊饲养中注意加强饲养管理,加强卫生保健。羔羊圈舍保持干燥,勤换垫草,注意消毒。冬季注意防寒保暖,夏季注意防暑降温。对体质较差的

羔羊可以注射维生素AD₃和亚硒酸钠防治佝偻病和白肌病,注射铁制剂防治犍牛贫血。羔羊出现精神萎靡,被毛不顺无光,较瘦弱时,可以接种正常羊的瘤胃内容物或使用产酶益生菌来促进谷物饲料和粗纤维的消化,促进瘤胃、网胃的发育,使其提前具有完善的消化能力。影响羔羊成活率和生长发育的疾病因素主要有羔羊肺炎和腹泻。生产中注意针对病因,及时预防。保证羔羊的健康。

我国种猪长期从国外进口被动局面有望改善

近日,“国家高新技术研究发展计划”(863计划)“猪分子细胞工程育种技术创新与优势性状新品系培育”专项实施会议在新兴县广东温氏食品集团公司(以下简称“温氏集团”)研究院举行,标志着温氏集团成为全国第一家主持863计划项目的民营企业。

由温氏集团主持的863计划“猪分子细胞工程育种技术创新与优势性状新品系培育”专项,主要是对猪分子细胞工程育种技术进行创新,并对优势性状新品系进行培育,这是国家科技部对温氏集团科研能力的肯定,也是科技部在产学研合作工作上的一次重要的尝试。项目的开展将推动和改善我国种猪长期以来从国外进口的被动局面,进一步提升我国肉猪产业的核心竞争力。(信息来源: <http://www.gdagri.gov.cn/>)

鸡腺胃型传染性支气管炎的实验病理学研究

魏昆鹏, 郭万华, 白丽璐, 陈立功*, 郝延刚
(河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 用疑似鸡腺胃型传染性支气管炎病鸡的腺胃组织匀浆, 经除菌处理, 人工接种健康雏鸡, 出现典型症状, 继而死亡。对人工感染病例进行了系统的病理学观察。人工感染病例和自然病例的病理变化基本相同, 其主要眼观病理变化为腺胃显著肿大、出血; 主要组织学变化为腺胃粘膜充血、出血、炎性水肿和浅层坏死。从自然病例和人工发病病例腺胃中均可分离到传染性支气管炎病毒。

关键词: 鸡; 传染性支气管炎; 腺胃型; 人工复制; 病理变化

中图分类号: S856.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0016-03

荷兰学者 Kouwenhoven 等^[1]将以病死鸡高度消瘦、腺胃显著肿大、腺胃乳头糜烂为病变特征的传染病称为传染性腺胃炎 (infectious proventriculitis, IP), 1994 年以来, 我国江苏^[2]、浙江^[3]、山东^[4]、河北^[5]、北京等省(市)不断有鸡传染性腺胃炎的流行, 发病鸡已逾数百万, 给养禽业造成了严重威胁。我国多数学者认为该病主要是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 引起的一种急性、高度接触性传染病。近年来, 笔者在流行病学调查和细菌学检验的基础上, 排除了该病为细菌性传染病的可能性。本试验从河北某地采集疑似腺胃型传染性支气管炎病鸡的病料, 接种健康雏鸡, 进行了鸡腺胃型传染性支气管炎的实验病理学研究, 以为该病的综合防制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 病料及处理 疑似腺胃型传染性支气管炎的 35 日龄病鸡于 2006 年 4 月采自河北某蛋鸡场。无菌操作, 解剖 20 只病鸡, 取严重肿大的腺胃, 按 1:5 比例加入灭菌双抗(青、链霉素各 3 000 IU/mL) 盐水, 研磨成匀浆, 4℃ 3 000 rpm 离心 30 min, 取上清加倍量灭菌双抗盐水, 置 37℃ 作用 30 min, 4℃ 8 000 rpm 离心 15 min, 取上清加双抗, 置 4℃ 冰箱过夜, 经无菌检查合格后, 部分上清用于感染雏鸡, 部分用于鸡胚接种。

1.2 人工感染雏鸡试验 自保定市某种鸡场购回种蛋, 自行孵化至出壳, 选取 79 只 1 日龄非免疫健康雏鸡, 随机分为 2 组, 其中 A 组 64 只, B 组 15 只。A 组鸡经滴鼻、点眼途径接种 1.1 中的病

料上清(0.5 mL/只), B 组为空白对照。2 组雏鸡分别隔离饲养, 每日进行观察, 及时记录发病情况和临床症状, 于接种后第 2d、4d、7d、14d、22d、35d 对 2 组鸡进行扑杀 (A 组每次 5 只, B 组每次 3 只), 记录大体病变。无菌操作采取 A 组典型病鸡的腺胃, 按 1.1 中方法处理后上清用于鸡胚接种。

1.3 病理组织学检查 取 1.2 中各扑杀时段雏鸡的腺胃, 以 10% 中性福尔马林溶液固定。所有组织按常规制作石蜡切片, H. E 染色, 用光学显微镜观察组织学变化。

1.4 病毒分离鉴定 自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司购回 SPF 种蛋, 自行孵化至 9~10 日龄。取 1.1 和 1.2 中病料上清经尿囊腔各接种 5 枚 9 日龄 SPF 鸡胚(0.2 mL/胚), 37℃ 培养, 剔除 24 h 内死亡鸡胚, 每天照蛋 3 次, 记录鸡胚死亡情况和胚体病变, 收集接种后第 24~144 h 的尿囊液。SPF 鸡胚继续传代到第 5 代进行鉴定和相关测定, 同时设置空白对照组。

2 结 果

2.1 试验鸡发病、死亡情况及临床症状 A 组鸡在接种后 10 h 开始发病, 发病率为 100%。临床表现与自然发病鸡相似: 初期表现精神沉郁, 严重时可见嗜睡, 采食、饮水减少, 拉黄色、白色稀粪, 或水样腹泻; 部分病鸡时常甩鼻, 羽毛散乱, 病情加重后, 病鸡双腿无力, 伏卧, 不愿行走, 濒死时鸣叫。接种后第 10 h 开始死亡, 至试验结束时共死亡 20 只(不含扑杀死亡部分), 致死率为 31.25%。B 组鸡至试验结束未见任何临床症状。

收稿日期: 2008-11-21

基金项目: 河北农业大学应用发展基金资助项目(YF2006401)



图1 接种后35d腺胃病变
A组病鸡腺胃严重肿大

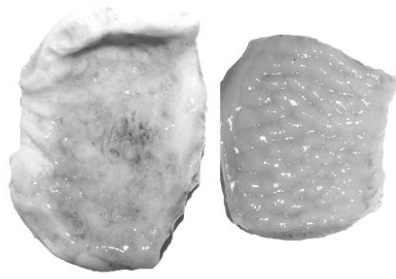


图2 接种后4d腺胃病变
A组病鸡腺胃(左),右侧为正常对照

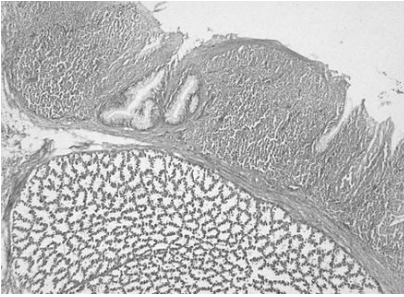


图3 接种后4d病鸡腺胃(H.E 100x)
固有层浸润的炎性细胞变性、坏死

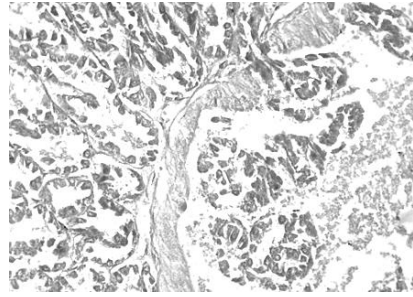


图4 接种后第4d病鸡腺胃(H.E 400x)
腺小管上皮脱落,腺腔中可见红染物质

2.2 大体病理变化 病鸡尸体极度消瘦,个体比同龄健康鸡小。接种后第4d剖检即可见腺胃明显增大(图1),腺胃壁增厚,剖开可见其粘膜乳头水肿突起,有的粘膜发生充血和出血,有的因粘膜组织坏死而形成凹陷的溃疡,周边出血(图2)。腺胃病变可持续至试验结束,后期病鸡腺胃极度肿胀,肿大如球状,腺胃壁可增厚2~3倍,有的病例腺胃浆膜严重坏死,乳头部分或全部变得平整融合,轮廓不清,可挤出脓性分泌物。肌胃瘪缩,肌肉弛软。B组鸡剖检后各器官均无肉眼可见变化。

2.3 病理组织学变化 接种后2d腺胃粘膜轻微脱落;接种后4d腺胃局部上皮完全破坏脱落,靠近食管处的腺胃固有层灶状浸润的炎性细胞(网状细胞、淋巴细胞)部分变性坏死(图3),部分集合窦腔中可见坏死脱落的腺小管上皮和红细胞、无结构的团块样物(图4);接种后7d腺胃表面上皮部分破坏脱落,固有层有多量炎性细胞浸润,粘膜下浅层和深层腺体层均见有明显炎症变化,很多腺管结构破坏,腺管间有多量炎性细胞广泛浸润;部分腺管上皮凝固性坏死。病变严重的,粘膜浅层组织发生凝固性坏死,常分离脱落。有的病鸡整个粘膜层完全发生坏死,坏死组织和炎性渗出物凝固形成厚层假膜,覆盖在腺胃表面,脱落

后即形成溃疡。

2.4 病毒分离鉴定 自然病例和人工病例的病料上清接种SPF鸡胚,未经处理的第1~10代病毒分离物经微量血凝试验测定,对1%的鸡红细胞不发生凝集。表明分离物中无新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)和产蛋下降综合征病毒(egg drop syndrome virus,EDSV)。经1%的胰酶处理后,所有病料的第1~10代病毒分离物可使1%的鸡红细胞发生凝集。随着盲传代数的增加,病毒的血凝价也不断升高,由第1代的(1~2)log₂升高至第10代的(7~11)log₂。第1和第2代鸡胚胚体无变化,从第3代开始胚体头部和腿部出血,胚体变小,重量减轻,盲传至第5代以后,胚体仅为正常胚的1/3大小,出现明显的抱头现象,卵黄收缩,羊水减少。自然病例和人工病例的病料分离毒可干扰NDV在鸡胚中的增殖,且其对NDV的干扰可被IBV阳性血清所抑制(待发表资料)。以上特征符合鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus,IBV)特性,因此可以认为IBV是IP的一种病原,这与文献^[6~10]报道的结果相同。

3 讨论

腺胃型鸡传染性支气管炎是目前广泛流行

的一种高度接触性传染病,其病原 IBV 可引起鸡死亡,而且临诊型和亚临诊感染(常被忽视)均会致使鸡群生产性能下降,饲料报酬降低。常继发或并发支原体病、大肠杆菌病、葡萄球菌病等,导致死淘率增加,还常被漏诊、误诊。该病原的血清型较多,新的血清型不断出现,加上不适当的免疫程序,常导致免疫失败,致使该病未能得到有效控制,对全球养禽业曾造成严重经济损失。人工复制试验结果表明,接种早期雏鸡即可发病表现明显的腺胃肿大,并且腺胃的特征性病变可一直持续到接种后 35 d。在病理剖检时发现少数病鸡出现肾脏肿大、花斑肾、输尿管扩张、管内充满白色尿酸盐。在本次腺胃型传支发病鸡群中是否有肾型传支的发生,有待进一步研究。病理组织学结果显示,人工复制病例主要特征为腺胃粘膜的坏死性炎症以至形成溃疡和卡他性肠炎,肝实质变性和多发性坏死灶,全身淋巴器官(脾、法氏囊及胸腺)实质萎缩,肾脏实质变性和局灶性外膜炎,部分病例有局灶性支气管炎。病理学检查表明,该病发生后可能造成感染鸡群免疫抑制,应引起养殖户的高度重视。



(上接第 8 页)

进行分析,且 Spectra-Quad 所用光线亮度非常低,不会加热或损伤样品。对于三聚氰胺来说,其含量越高所反射出的光线就越少。实际检测中,检测人员可以将 Spectra-Quad 传感器固定到任何现有的传送装置上,通过使用粉末取样仪,实现对气动传输产品中三聚氰胺含量的连续检测,并能较好的解决检测结果受蛋白质含量影响的问题。

4 小结

三聚氰胺虽是一种用途广泛的有机化工原料,但添加在饲料中,不仅对养殖业具有不良影响,还对人类健康存在着严重威胁。针对三聚氰胺在饲料中的添加给养殖业及人类的健康带来的一些问题,我们应该建立完善的饲料标准体系,重视动物源性饲料生产,使《饲料法》与国际接轨,建立稳定的饲料安全监管体系,加强饲料监测体系建设,加大打击掺杂使假、违规添加违禁物行为的力度,大力提倡开发无污染、无残留的绿色饲料,提供无污染、无残留的安全动物性食品。

参考文献:

- [1] Kouwenhoven B, Davelar F G, Wasum J N. Infectious proventriculitis causing grunting in broilers[J]. Avian Pathology, 1987, (7):183-187.
- [2] 王永坤,朱国强,田慧芳,等.鸡传染性腺胃病的研究[J].江苏农学院学报,1996,17(1):52-53.
- [3] 周继勇.传染性腺胃炎病毒 ZJ971 株的一些生物学特性[J].畜牧兽医学报,2000,31(3):229-234.
- [4] 沈美艳,牛钟相,朱瑞良,等.鸡传染性腺胃炎流行病学调查[J].山东畜牧兽医,1999,5:32-33.
- [5] 姜北宇,刘月焕,郑世兰,等.鸡传染性腺胃炎病原的分离鉴定[J].中国兽医科技,2000,30(2):3-5.
- [6] 王玉东,王永玲,张子春,等.鸡腺胃型传染性支气管炎病毒(QXIBV)的分离与鉴定[J].中国动物检疫,1998,15(2):1-2.
- [7] 朱万光,杜元钊,范根成,等.鸡传染性腺胃炎的分离初步调查和防治试验[J].中国兽医科技,1997,27(12):42-43.
- [8] 王永玲,王玉东,张子春,等.鸡腺胃型传支病毒(QX 株)与呼吸型及肾型毒株理化特性的比较[J].中国兽医杂志,1998,24(1):12-13.
- [9] 朱国强,庄国宏,周祖宏,等.鸡腺胃型 IBV 分离株血凝特性初探[J].中国兽医杂志,1997,23(1):11-12.
- [10] 荣骏弓,康丽娟,谷守林,等.腺胃型鸡传染性支气管炎病毒 Hu98 株的分离鉴定[J].中国兽医科技,2000,30(6):23-25.

参考文献:

- [1] 赖碧清,郑晓航,韩银涛.高效液相色谱-四极杆质谱联用测定饲料中三聚氰胺含量[J].饲料工业,2008,29(4):47-48.
- [2] 蔡勤仁,欧阳颖瑜,钱振杰,等.超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J].色谱,2008,26(3):339-342.
- [3] 林祥梅,贾广乐,梅林,等.三聚氰胺的毒性研究[J].毒理学杂志,2008,22(3):216-218.
- [4] 吴明礼,陈彩虹.高效液相色谱法(HPLC)测定单氰胺中三聚氰胺的含量[J].宁夏石油化工,2005,2:24-26.
- [5] 倪沁颜.高效液相色谱法(HPLC)测定饲料中三聚氰胺的含量[J].福建分析测试,2008,17(1):57-59.
- [6] 黄芳,黄晓兰,吴惠勤,等.高效液相色谱-质谱法对饲料及食品添加剂中三聚氰胺的测定[J].分析测试学报,2008,27(3):313-315.
- [7] 王征,GC-MS 法测定动物食品中的三聚氰胺[J].福建分析测试,2008,17(2):1-4.
- [8] 刘梅,李金强,田德金,等.固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测食品中的三聚氰胺[J].化学分析计量,2008,17(2):48-50.
- [9] 王亚吨,林海丹,邓国东,等.反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量[J].广东饲料,2008,17(3):41-43.
- [10] 胡阶明.Spectra_Quad 实现三聚氰胺含量在线检测[J].食品安全导刊,2008,2:56-57.

鸡肺石蜡切片 AgNOR 染色方法的探讨

曾健滢, 冯宇麟, 李英, 潘家强
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0019-02

AgNOR银染法是病理实验室常用的染色方法,它能反映细胞增殖及有助于肿瘤的鉴别诊断,在兽医临床上有着不可忽视的作用。AgNOR内的嗜银蛋白为一种酸性非组蛋白,其带负电荷的羧基首先与银离子结合,使银离子还原成金属银,形成在亚显微结构下可见的微小核心,并以此作为银继续沉淀的集中点。然后,由较小负电荷的巯基吸收银,使微小的银发展成特征性的黑点,显微镜下显示为AgNOR颗粒^[1]。本实验采用了鸡肺的石蜡切片,使用AgNOR染色并进行小动脉血管平滑肌细胞AgNOR的平均计数,取得了较满意的效果;对AgNOR染色胶银工作液的配制和染色方法进行了比较。结果表明,采用的竖式盖片染缸染色法极大地节约了AgNOR的使用量,镜检清晰显示AgNOR颗粒并能用于计数。操作方法简便,重复性好^[2]。针对当前国内文献对AgNOR染色方法报道不多的情况,现对染色方法及结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 20%、50%胶银工作液的配制 明胶溶液(a液)为2g明胶加入1%甲酸100mL,加热混匀溶解。4℃保存^[2]。20%、50%硝酸银溶液(b液)为20g、50g AgNO₃加双蒸水100mL配制,4℃避光保存。用前将a液与b液按1:2体积比例混合即成^[3]。

1.1.2 5%硫代硫酸钠水溶液的配制 5g硫代硫酸钠溶于100mL水。

1.1.3 乙醇乙酸液的配制 36%冰醋酸溶液与无水乙醇按1:2比例混合。

1.1.4 切片处理 鸡肺组织以中性甲醛固定24h以上,梯度酒精脱水,二甲苯透明后作石蜡包埋处理,制成4μm石蜡切片。切片常规脱蜡,双蒸馏水冲洗,乙醇乙酸液中浸泡5min后准备染色。

1.2 染色方法

1.2.1 卧式盖片染缸染色法

1.2.1.1 切片放入100mL卧式盖片染缸中,加入现配20%胶银工作液约100mL,于室温避光染色40min,用双蒸水迅速冲洗1~2min,5%硫代硫酸钠水溶液中定影2min,双蒸水充分冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片^[4]。

1.2.1.2 切片放入100mL卧式盖片染缸中,加入现配50%胶银工作液100mL,室温避光染色40min,用双蒸水迅速冲洗1~2min,5%硫代硫酸钠水溶液中定影2min,双蒸水充分冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.2 滴片染色法 将50%硝酸银水溶液滴加在切片的目标区域内,室温避光染色40min,5%硫代硫酸钠水溶液中定影2min,双蒸水充分冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.3 竖式盖片染缸染色法 将切片置于竖式盖片染色缸中,将A液与B液按体积1:2比例混合后倒入,即A液14mL, B液7mL。37℃烘箱避光染色40min。40~50℃温双蒸馏水冲洗。切片置5%硫代硫酸钠定影2min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2 结果

2.1 卧式盖片染缸染色法

2.1.1 使用20%的明胶工作液染片后,镜检时发现AgNOR颗粒清晰可见,但血管平滑肌胞质与胞核同样呈现淡黄色,即不能分辨出胞核,故不能用于AgNOR颗粒计数。

2.1.2 使用50%的明胶工作液染出来的片镜检绝少非特异银染颗粒,胞质呈淡黄色,胞核黄褐色,AgNOR颗粒为黑色颗粒状。与胞核对比明显,清晰可见。但以同等条件再次染色,切片未能着色,意味工作液失效。

2.2 滴片染色法 镜检发现胞质呈淡黄色,胞核黄褐色,AgNOR颗粒为黑色颗粒状,整张片内夹杂较多非特异银染颗粒沉淀,与AgNOR颗粒相似,很

难分辨。且重复性差。

2.3 竖式盖片染缸染色法 镜检发现非特异银染颗粒沉淀少,细胞核结构着色清晰,胞质呈淡黄色,细胞核呈棕黄色,核内可见清晰的棕黑色 Ag-NOR 银染颗粒。对比度好,结果满意。与采用 50%的明胶工作液的卧式盖片染缸染色法的结果相似,可用于 AgNOR 颗粒计数。

3 小结与讨论

为节约硝酸银的使用量,本实验采用了多种 AgNOR 染色方法并进行比较,最后得出符合实际应用的方法。现对本实验总结如下:

3.1 染色方法的比较 比较以上三种染色方法,以竖式盖片染缸染色法最为实用,使用竖式盖片染色缸,Z型放置玻片,最多可以放9张。捞片时注意使组织片位于载玻片下1/3处。则共需染液20 mL即可。这可极大地节省硝酸银的使用量,并且避免了由于重力作用使非特异银染颗粒沉淀于切片上。

3.2 实验材料准备及染色过程中的注意事项 ①染色缸、容器瓶等实验中需使用的玻璃器皿,建议在使用前先泡酸过夜,以减少非特异性离子与硝酸银结合;②采用硝酸银化学纯试剂,使用超纯水配制50%硝酸银水溶液(去离子水也可,超纯水效果较好);③在本实验过程中,曾尝试水浴加热至37℃或室温放置,发现并无明显区别,建议直接放37℃烘箱,恒温并避光;④染色完毕后,使用40~50℃温水冲洗的效果比较好,但不能放自来水下冲洗,否则会出现大量非特异银染颗粒沉淀,且冲洗

时间越长非特异银染颗粒沉淀越多,完全不能用于统计^[5];⑤染色时间过短,会出现细胞核着色太浅甚至不着色的情况,需按实际情况设计染色时间。一般在30~45 min之间。细胞核与特异性银染颗粒对比清晰,无或绝少非特异银染颗粒的染片为良好染片(图1);⑥染液配好后需尽快使用。

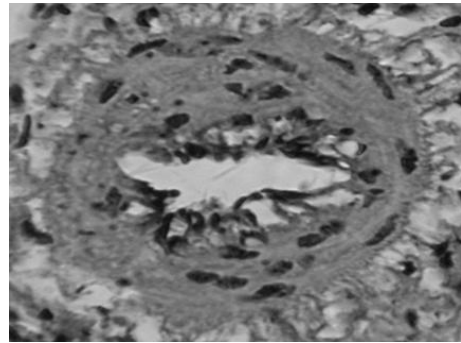


图1 鸡肺小动脉 AgNOR 染色

参考文献:

[1] 刘勇,戴艳枝.核仁组成区相关嗜银蛋白染色方法探讨[J].九江医学,1997,12(1):31-32.

[2] 闫新林.AgNOR染色方法的改进及套染技术研究[J].四川省卫生管理干部学院学报,1997,16(2):76.

[3] 张春蕾,韩冬.一种改良的快速AgNOR特殊染色简介[J].中国医学文摘,2008,22(3):129.

[4] 刘凤阁,吴国新,林桂琴.关于核仁组成区的研究概况[J].齐齐哈尔医学院学报,1995,16(3):224-227.

[5] 宗建国.核仁组成区相关的嗜银蛋白(Ag-NOR)快速测定试剂盒研究及应用[J].大连医学院学报,1993,15(3):215.

2009“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,本刊决定评选2009年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊2010年第1期公布。

- 1、**评选范围:**本刊2009年度1-6期发表的文章。
- 2、**评选数量:**优秀论文数篇,分设一、二、三等奖。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。
- 3、**奖金来源:**奖金20000元,由广东永顺生物制药有限公司赞助。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部
二〇〇九年一月二十六日

中西医结合治疗亚洲黑熊肝硬化继发腹水症

李纪春¹, 陈武², 黄勉²

(1. 广西柳州市动物疫病预防控制中心, 广西 柳州 545005; 2. 广州动物园, 广东 广州 510070)

中图分类号: S853.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0021-02

2007年11-12月,我中心接诊来自广西某地的13头8月龄左右的患病亚洲黑熊,经检查后诊断为肝硬化,部分继发胆囊炎和细菌感染。采用抗菌药物与中药配合对10头患病动物进行治疗,除2头来不及治疗死亡外,其他8头小熊均有明显的好转,随访1年,未见复发。

1 临床症状

患病的亚洲黑熊共13头,体重42~56 kg,年龄2-3岁,接诊时已死亡3头。主要表现为食欲不振,不喜活动,精神不佳,捕捉时挣扎乏力,毛色

暗淡无光,机体消瘦,腹围膨隆,尿少色黄,角膜黄染,部分病熊口舌黏膜黄染,皮下出血。触诊腹部敏感,有波动感。

2 实验室检查

2.1 血液生化检测 采集熊外周血液进行检测,将检测结果与参考值^[1]进行比较,结果发现患熊存在不同程度白细胞总数升高、低血糖、胆汁滞留、谷丙转氨酶与谷草转氨酶异常升高、血小板降低、总蛋白降低、白蛋白降低等情况(表1),说明患病黑熊的肝功能出现异常。

表1 亚洲黑熊治疗前血液生理生化指标检测值

项目	黑熊1	黑熊2	黑熊3	黑熊4	黑熊5	黑熊6	黑熊7	黑熊8	黑熊9	参考值 ^[1]
白细胞总数($\times 10^9/L$)	17	21.2	49.9	10.3	22	19.8	22.1	20.7	22.4	4.2~12.3
中性分叶核细胞(%)	70	68	80	61	70	63	64	64	71	
淋巴细胞(%)	30	30	20	39	30	37	36	36	29	
总胆红素TBIL($\mu mol/L$)	27.9	7.6	21.4	6.5	134.8	10.3	6.7	28.9	29.4	0~7
间接胆红素DBIL($\mu mol/L$)	21.3	6.2	18	2.3	87.8	8.5	5.3	25.9	15	0~2
血小板计数PLT($\times 10^9/L$)	121	81	104	323	75	80	110	220	240	230~670
谷丙转氨酶ALT(u/L)	113	60	61	70	43	53	120	69	99	0~41
谷草转氨酶AST(u/L)	172	167	167	85	203	128	165	152	237	0~44
总蛋白TP(g/L)	60.6	63.3	52.7	58.7	56	76.8	76.7	52.9	59	62~95
白蛋白ALB(g/L)	31.2	33.8	22.6	34.4	21.5	37	36.6	26.2	22.6	32~52
球蛋白GLB(g/L)	32.8	39.5	30.1	27.3	34.5	39.8	40	36.5	36.2	19~27
葡萄糖GLU(mmol/L)	1.4	3.1	1.5	3.2	1.8	2.3	2.3	1.8	2.2	2.7~9.7

2.2 B超检查 捕捉患熊进行B超检查,B超影像显示肝表面欠光滑,肝内回声密集增强,不均匀;肝内胆管扩张,最大约0.4 cm,胆总管扩张,肝门处与门脉构成双管征,内径约0.6 cm,肝外胆管显示不清。右膈下间隙见液性无回声区,深约5 cm。膀胱陷窝处见少量液性暗区。这提示患熊肝脏出现纤维增生,并有不同程度的腹水。

2.3 病原细菌的分离与鉴定 无菌操作从死亡

病例的心脏、肝脏、肺脏与肾脏等器官采集样本,接种于肉汤培养,如有细菌生长则转接于营养琼脂平板作细菌鉴定。结果从2头死亡黑熊检测到具有致病能力的大肠埃希氏菌与奇异变形杆菌。

2.4 其他检查 从患熊臂静脉采血,分离血清与人源甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒抗原进行免疫学试验,结果为阴性。对黑熊的食物进行黄曲霉毒素检查未见超标。对饲养区水质进

行抽检,结果符合国家饮用水标准。

3 病理变化

3.1 剖检变化 死亡黑熊皮下有大量的凝血块,可视黏膜黄染,脂肪黄染,腹腔积聚大量黄色透明的液体,肝脏土黄色,表面有多量纤维增生物,体积变小、质硬易脆,部分病例肝脏表面有针尖大小的出血点。

3.2 病理组织学变化 肝脏充血、出血,出血灶内可见含铁血黄素,肝细胞严重脂肪样变性,小叶液化坏死,部分病例肝内胆汁淤积明显,胆囊黏膜炎性增生,局部胆囊黏膜层糜烂,上皮细胞坏死。

4 诊断

经临床症状、实验室检查诊断为肝硬化,部分病例并发胆囊炎和细菌感染。

5 治疗

5.1 根据病情的不同,对病情严重的4头黑熊进行输液治疗。根据药敏结果联合应用头孢噻肟钠、丁胺卡那霉素进行抗菌消炎;应用葡醛酸钠、茵桅黄注射液、黄芪注射液改善肝脏功能,减轻黄疸症状并消除腹水。以上药物连续应用10日以上,直至症状有明显缓解。在输液的同时,投喂甘利欣胶囊(甘草酸二胺)、健胃消食片(主要成份是太子参、陈皮、山药、麦芽、山楂等)以改善肝脏功能、增强食欲。自拟中药配方:泽泻1g,山楂3g,丹参2g,炙内金0.5g,柴胡1g,淮山药1g,白扁豆0.5g,砂仁0.5g,大腹皮0.5g,麸炒枳壳1g,甘草0.5g,莲子1g,黄芪4.5g,将上述药物碾磨成粉,兑水灌服。口服与饮用药物在停止输液

后继续服用1个月。

5.2 对其他6头病情较轻的黑熊,投喂头孢氨苄胶囊以抗菌消炎,连续15天,同时投服甘利欣胶囊、健胃消食片与自拟中药制剂,连续1个月。

5.3 调整患病黑熊的日粮,饲料配方以青菜、水果为主,酌情投喂少量窝窝头和稀饭,严格控制水与钠离子的摄入量。

6 治疗效果

6.1 2头黑熊因肝功能严重衰竭,分别于接诊当天和第2天死亡。其他8头黑熊经过1个月的治疗,食欲恢复正常,皮肤及黏膜黄染消退,腹水消退,腹围减小至正常,尿液变清亮,活动渐趋活跃,且毛色好转。停药后1年随访,未见再发病。

6.2 治疗1个月后抽取熊外周血液检查,结果显示白细胞总数恢复至正常水平,血糖水平回升至正常水平,血小板计数(PLT)、血清总胆红素(TBIL)、间接胆红素(DBIL)水平均恢复正常水平,血清总蛋白和白蛋白水平回升,球蛋白水平基本恢复正常(见表2)。说明患熊的肝脏与胆囊炎症消失,肝脏功能得到改善。

7 小结

7.1 肝硬化继发腹水属于中医“积”和“鼓胀”范畴^[2]。中医认为,鼓胀一病,多由肝、脾、肾三脏功能失调,气血水相搏结而成的本虚标实,错综复杂之证。肝郁、脾虚、肾亏是病之本,气滞、血瘀、水聚是病之标。肝郁气滞,气滞则血瘀,而致癥积痞块,脉络怒张;脾失健运,则清浊不分,水湿聚于腹

(下转第34页)

表2 亚洲黑熊治疗后血液生理生化指标检测值

项目	黑熊1	黑熊2	黑熊3	黑熊4	黑熊5	黑熊6	黑熊7	黑熊8	黑熊9	参考值 ^[1]
白细胞总数($\times 10^9/L$)	11.6	15.9	12.3	6.1	12.5	10.5	12.1	13.4	12.8	4.2~12.3
中性分叶核细胞(%)	64	32	62	58	66	60	60	61	69	
淋巴细胞(%)	36	30	38	42	34	40	40	39	31	
总胆红素 TBIL($\mu mol/L$)	4.4	1.7	2.8	2.2	10.6	1.5	1.5	2.7	3.8	0~7
间接胆红素 DBIL($\mu mol/L$)	2.4	0.3	2.2	1.4	7.7	0.9	1	1.1	2.3	0~2
血小板计数 PLT($\times 10^9/L$)	819	319	361	393	251	225	343	281	231	230~670
谷丙转氨酶 ALT(u/L)	43	48	51	41	37	26	47	52	41	0~41
谷草转氨酶 AST(u/L)	129	118	129	63	134	92	112	107	121	0~44
总蛋白 TP(g/L)	71.3	71.5	62.6	65.1	67.3	73.5	74.3	67.2	63.6	62~95
白蛋白 ALB(g/L)	38.8	39.8	33.7	38.5	37.5	41	39.8	39.3	39.1	32~52
球蛋白 GLB(g/L)	32.5	31.7	38.9	27.6	29.8	32.5	34.5	27.9	24.5	19~27
葡萄糖 GLU(mmol/L)	3.1	4.4	4.7	4.7	3.8	4.8	4.9	4.4	3.9	2.7~9.7

培养液磷含量和 pH 值对鸡离体小肠磷吸收的影响

徐运杰, 方热军*, 霍振华, 蒋小丰

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 本研究主要探讨了培养液不同 pH 值和磷含量对鸡离体小肠磷吸收的影响, 为体外培养鸡小肠合理选择培养液 pH 值和用外翻肠囊法评定饲料有效磷时合理选择培养液磷浓度提供参考依据。采用 2 个单因子随机试验, 每个因子 4 个处理。48 只 30 日龄体重相近的三黄肉公鸡的十二指肠、空肠和回肠肠囊随机分配到 8 个处理中, 每个处理 6 个重复, 每个重复 1 个肠囊, 39℃ 培养 50 min。结果表明: pH 5.0~7.0 时, 肠囊的磷吸收量线性增加; pH 8.0 时, 肠囊的磷吸收量降低; 与 pH 5.0 比较, pH 7.0 时, 肠囊的磷吸收量极显著增加 ($P < 0.01$)。培养液磷含量在 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 肠囊的磷吸收量与磷含量呈正相关; 当磷含量增加到 400 $\mu\text{g/mL}$, 十二指肠肠囊和空肠肠囊的磷吸收量开始降低; 磷吸收率与培养液磷含量之间呈负相关, 不同处理之间差异极显著 ($P < 0.01$)。结果显示: 以肉仔鸡为动物模型, 用外翻肠囊法评定饲料有效磷时, 培养液适宜 pH 为 6.0~7.0; 有效磷含量不能超过 200 $\mu\text{g/mL}$, 以 50 $\mu\text{g/mL}$ 左右为宜。

关键词: pH 值; 外翻肠囊; 磷含量; 乳酸脱氢酶; 肉仔鸡

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0023-05

The Influence of Phosphate Levels and pH in Culture Medium on Phosphorus Absorption of Small Intestine in Chickens

XU Yun-jie, Fang Re-jun, Huo Zhen-hua, Jiang Xiao-feng

(College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: The experiment on investigating the effects of phosphate levels and pH in culture medium on absorption of Pi was carried out to provide reference for reasonable selection of pH and phosphate levels during phosphorus absorption experiment in vitro with small intestines of chickens. Two experiments were done and each had one single factor and four treatments. Sacs of duodenum, jejunum and ileum from 48 cocks of 30 days old were randomly distributed to eight treatments. There were six replicates in each treatment and there was one sac in each replicate. Each sacs were cultured 50min at 39℃. The results showed that the phosphorus uptake of gut sacs was increased linearly when pH value was from 5.0 to 7.0, and the phosphorus uptake began to reduce when pH value was 8.0. Compared with pH 5.0, the absorption of phosphorus increased significantly at pH 7.0 ($P < 0.01$). Phosphorus uptake and phosphorus content were positively correlated when phosphorus contents in medium from 50 $\mu\text{g/mL}$ to 200 $\mu\text{g/mL}$. But the phosphorus uptake of duodenum and jejunum began to reduce when phosphate level was 400 $\mu\text{g/mL}$. It was a negative correlation between phosphorus absorption rate and phosphorus content in medium, and the difference was significant ($P < 0.01$). The results suggested that the optimum pH was from 6.0 to 7.0, the available phosphorus content was no more than 200 $\mu\text{g/mL}$ and about 50 $\mu\text{g/mL}$ was more appropriate in culture medium when assessing feed available phosphorus with the method of everted gut sacs.

Key words: pH value; everted gut sacs; phosphorus content; lactate dehydrogenase; chickens

外翻肠囊法是在体外培养小肠肠环技术的基础上发展而来的。它是指在动物麻醉无痛或屠宰状态下立即分离小肠, 去掉肠系膜, 用生理盐水或缓冲液冲洗干净, 然后根据实验目的将所需肠段分割为若干小段, 外翻使肠粘膜向外, 结扎一端形

成肠囊状, 灌注人工培养液后结扎另一端, 置于添加有被测物质的培养液中, 通入 95% 氧气和 5% 二氧化碳的混合气体, 培养一定时间后, 根据囊内外被测物质的变化来反应肠道对物质的吸收状况的一种生理学实验方法。该方法操作简便, 实验条件

容易控制,重复性好,经济适用。如果能够用这种方法来评定饲料有效磷,既可以节约成本,又能够增加效率。外翻肠囊法已用于各种养分如氨基酸与肽^[1]、葡萄糖^[2]、脂质^[3]、矿物元素^[4]的吸收动力学研究。但是,以前的研究几乎都是用 Wistar 鼠等大鼠作为模型,直接用畜禽的小肠进行相关研究以及用该方法评定饲料有效磷是否具有可行性还鲜见报道。如果以肉仔鸡小肠为试验材料,采用外翻肠囊法评定饲料有效磷时,培养液 pH 值和磷含量对肠囊磷吸收的影响有待进一步研究。因此,本试验探索了培养液不同磷含量和 pH 值对鸡离体小肠磷吸收的影响,旨在为以生长肉仔鸡为动物模型,用外翻肠囊法评定饲料有效磷时,选择适宜的培养液 pH 值和磷含量提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 ①等渗溶液(g/L):NaCl 8.5322, KCl 0.2982; ②pH7.0 基础台氏液(g/L):NaCl 8.00, KCl 0.20, NaHCO₃ 1.00, CaCl₂ 0.20, MgCl₂ 0.10, 另加葡萄糖 3 g/L 和 L-谷氨酰胺(取 L-谷氨酰胺 6 g,溶于蒸馏水 200 mL 中,每 100 mL 培养液中加 1 mL L-谷氨酰胺溶液); ③其它:NaH₂PO₄、Tris-HCl 缓冲液、2,4-二硝基苯肼、辅酶 I (NAD)、丙酮酸钠、乳酸、NaOH、稀 HCl、分光光度计、pH 计、微量移液枪、50 mL 锥形瓶等。

1.2 肠囊的制作 48 只 30 日龄体重相近的三黄公鸡,禁食 12 h 后颈静脉放血,沿腹中线打开腹腔,取出整段小肠,放入 25℃ 氧气饱和的等渗溶液中,去掉肠系膜和脂肪,然后分别取出所需的三个肠段。十二指肠自肌胃远端向后取 14 cm 左右,空肠自胆管远端向后取 14 cm 左右,回肠自梅克尔憩室向后取 14 cm 左右,分别放入加有 25℃ 氧气饱和等渗溶液的三个容器中,用玻璃棒小心外翻后,先结扎肠囊一端,然后向浆膜腔中注入 1.5 mL pH7.0 的氧气饱和的基础台氏液。注入

后,结扎另一端,然后去掉两端受损多余的部分,即成外翻肠囊,每个肠囊长 10 cm。称重并记录好每个肠囊的湿重。

1.3 试验方法 ①磷含量设 50、100、200、400 μg/mL 四个处理,在基础台氏液中加 NaH₂PO₄, pH7.0; ② pH 值设 5.0、6.0、7.0 和 8.0 四个处理,磷含量是 200 μg/mL。采用两个单因子完全随机试验设计,十二指肠、空肠和回肠各 8 个处理,每个处理 6 个重复,每个重复 1 个肠囊。把制好的肠囊随机加入有 30 mL 不同处理培养液的小锥形瓶中,向瓶中通入足够的 O₂,迅速盖紧密封。39℃ 条件下 80 rpm 水浴振荡培养 50 min。

1.4 磷吸收的分析 培养完后,取出锥形瓶,立即从 4 个 pH 处理的每个重复中吸取 0.1 mL 培养液放入 25 mL 比色管中,用于分析乳酸脱氢酶(LDH)活力。然后,迅速取出肠囊,用蒸馏水冲洗外表面,过滤培养液,定容至 250 mL。最后,参照洪庆涛^[5]的 LDH 比色法分析培养液中 LDH 的活力,用钼黄比色法测定培养液中初始磷含量和终末磷含量。最后,采用减量法计算肠囊的磷吸收量和吸收率,计算公式如下:

$$\text{磷吸收率(\%)} = \frac{\text{培养液中初始磷含量} - \text{培养液中终末磷含量}}{\text{培养液中初始磷含量}} \times 100\%$$

$$\text{磷吸收率}(\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}) = \frac{(\text{培养液中初始磷含量} - \text{培养液中终末磷含量})/\text{肠囊湿重}}{5/6}$$

1.5 数据统计分析 试验数据以 Mean ± SD 表示,用 SPSS16.0 软件进行单因子方差分析,用 LSD 法进行多重比较,显著水平选择 0.05。

2 结果与分析

2.1 磷含量对磷吸收的影响 从表 1 可知,回肠肠囊对磷的吸收量随培养液中磷含量的增加而升高,从 50 μg/mL 时 0.14 ± 0.02 μg/mg·h 上升至差异显著(P < 0.05)。但十二指肠、空肠与回肠之间

表 1 磷含量对磷吸收的影响 (pH=7.0)

单位: μg/mg·h

肠段	磷含量 (μg/mL)			
	50	100	200	400
十二指肠	0.27 ± 0.01 ^{Aac 1)}	0.33 ± 0.04 ^{Ab}	0.37 ± 0.07 ^{Ab}	0.20 ± 0.08 ^{Ac}
空 肠	0.29 ± 0.01 ^{Aabc}	0.33 ± 0.03 ^{Ab}	0.38 ± 0.11 ^{Ab}	0.23 ± 0.09 ^{Ac}
回 肠	0.14 ± 0.02 ^{Bd}	0.19 ± 0.04 ^{Bcd}	0.25 ± 0.08 ^{Bcd}	0.27 ± 0.10 ^{Bc}

1): 同行中标有不同小写字母者表示差异显著(P < 0.05),相同小写字母者为差异不显著(P > 0.05); 同列肩标中具有不同大写字母者表示差异极显著(P < 0.01),相同大写字母间表示差异不显著(P > 0.05)。

有所差别,培养液中磷含量在 50~200 μg/mL 之间时, 两者的磷吸收量与磷含量之间呈正相关。200 μg/mL 时各肠段肠囊的磷吸收量显著高于 50 μg/mL 时吸收量 (P<0.05); 当磷含量增加至 400 μg/mL 时, 吸收量反而下降。十二指肠从 200 μg/mL 时 0.37±0.07 μg/mg.h 下降到 0.20±0.08 μg/mg.h, 空肠从 200 μg/mL 时的 0.38±0.11 μg/mg.h 下降到 0.23±0.09 μg/mg.h, 差异极显著 (P<0.01)。从不同肠段来看, 磷含量在 50~200 μg/mL 时, 十二指肠和空肠的磷吸收量与回肠之间有极显著差异 (P<0.01), 400 μg/mL 时, 三者之间差异不显著 (P>0.05)。

肠囊磷吸收量与培养液磷含量之间的线性关系见表 2。由于磷含量 400 μg/mL 时, 十二肠和空肠肠囊的磷吸收量降低, 因此没有进行相关性分析。从表 2 可知, 空肠肠囊的磷吸收量与培养液磷含量之间的相关性最好, R² 达 0.9842, 其次是十二指肠, R² 为 0.9098, 回肠最差, R² 为 0.8054。

表 2 磷含量与磷吸收量之间的线性关系 (y: 吸收量, x: 磷含量)

肠 段	50~200 μg/mL		50~400 μg/mL	
	线性方程	R ²	线性方程	R ²
十二指肠	y=0.0006x+0.250	0.9098	—	—
空 肠	y=0.0006x+0.265	0.9842	—	—
回 肠	—	—	y=0.0003x+0.148	0.8054

2.2 培养液磷含量对离体鸡小肠磷吸收率的影响

从表 3 可知, 磷吸收率随着培养液中磷含量的增加而降低, 同一肠段不同处理之间差异极显著 (P<0.01)。培养液中磷含量为 50 μg/mL 时, 磷的吸收率从十二指肠肠囊至回肠肠囊分别是 (81.43±3.58)%、(88.42±2.44)% 和 (38.63±6.37)%; 当磷含量达到 400 μg/mL 时, 磷的吸收率从十二指肠肠囊到回肠肠囊分别降到 (7.72±2.91)%、(8.58±3.41)% 和 (9.50±5.93)%。

培养液磷含量与磷吸收率之间的线性关系见

表 3 磷含量对磷吸收率的影响 (%)

肠 段	磷含量			
	50 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/mL	400 μg/mL
十二指肠	81.43±3.58 ^{ab}	50.00±5.40 ^b	28.21±5.34 ^c	7.72±2.91 ^b
空 肠	88.42±2.44 ^a	49.17±4.18 ^b	28.70±8.29 ^c	8.58±3.41 ^b
回 肠	38.63±6.37 ^a	25.99±5.39 ^b	17.78±5.87 ^c	9.50±5.93 ^b

1): 同行肩标不同字母者表示差异极显著 (P<0.01), 相同字母为差异不显著 (P>0.05)。

表 4。从表 4 可知, 两者之间的线性关系较好, 十二指肠的 R² 为 0.8597, 空肠的 R² 为 0.8131, 回肠的 R² 为 0.8589。

表 4 磷含量与磷吸收率之间的线性关系 (y: 吸收率, x: 磷含量)

肠 段	50~400 μg/mL	
	线性方程	R ²
十二指肠	y=-0.0019x+0.7726	0.8597
空 肠	y=-0.002x+0.8096	0.8131
回 肠	y=-0.0007x+0.3692	0.8589

2.3 pH 对磷吸收的影响

由表 5 数据可知, pH 5.0~7.0 时, 十二指肠、空肠和回肠肠囊的磷吸收量随 pH 值的增加而增加。pH 7.0 时, 肠囊的磷吸收量显著高于 pH 5.0 时的磷吸收量 (P<0.05), 但与 pH 6.0 之间没有显著差异 (P>0.05)。培养液 pH 8.0 时, 十二指肠和空肠肠囊的磷吸收量显著低于 pH 7.0 时的磷吸收量 (P<0.05), 而与 pH 5.0 和 6.0 之间无显著性差异 (P>0.05)。回肠肠囊的磷吸收量虽然降低, 但与 pH 6.0 和 7.0 之间差异不显著 (P>0.05), 仍然显著高于 pH 5.0 时的磷吸收量 (P<0.05)。

培养液 pH 值和肠囊磷吸收量之间的相关性分析结果见表 6。从表 6 可知, pH 5.0~7.0 时, 肠囊的磷吸收量与 pH 值之间有较好的正相关, 十二指肠、空肠和回肠的 R² 分别是 0.8811、0.8929 和 0.8242。由于 pH 8.0 时, 肠囊的磷吸收量降低, 因此, 显著降低了 pH 和肠囊磷吸收量之间的正相关性, pH 5.0~8.0 时, R² 从十二指肠到回肠分别是 0.1324、0.1661 和 0.4980。

表 5 pH 对磷吸收的影响 (磷含量 200 μg/mL)

肠 段	pH 值			
	5.0	6.0	7.0	8.0
十二指肠	0.25±0.05 ^{ab}	0.34±0.06 ^{bc}	0.36±0.07 ^c	0.29±0.04 ^{ab}
空 肠	0.24±0.06 ^a	0.36±0.09 ^{bc}	0.39±0.09 ^c	0.30±0.05 ^{ab}
回 肠	0.17±0.04 ^a	0.26±0.05 ^b	0.27±0.05 ^b	0.25±0.03 ^b

1): 同行肩标中, 小写字母不同者表示差异显著 (P<0.05), 相同者为差异不显著 (P>0.05)。

表 6 pH 与磷吸收量之间的线性关系 (y: 吸收量, x: pH)

肠 段	pH 5.0~7.0		pH 5.0~8.0	
	线性方程	R ²	线性方程	R ²
十二指肠	y=0.055x-0.013	0.8811	y=0.014x+0.219	0.1324
空 肠	y=0.075x-0.120	0.8929	y=0.021x+0.186	0.1661
回 肠	y=0.05x-0.067	0.8242	y=0.025x+0.075	0.4980

2.4 pH 对培养液中 LDH 活力的影响 从表 7 可知, 培养液中 LDH 活力受 pH 影响较大。pH 5.0~7.0 时, 培养液中 LDH 活性呈线性降低, pH 7.0 时, 培养液中 LDH 活性都极显著低于 pH 5.0 时 LDH 活性 ($P < 0.01$), 与 pH 6.0 之间没有明显差异 ($P > 0.05$)。当培养液 pH 升高到 8.0 时, 培养液中 LDH 活性反而增加, 但与 pH 7.0 时比较, 十二指肠差异不显著, 空肠和回肠达到极显著水平 ($P < 0.01$)。从不同肠段来看, 回肠培养液中 LDH 活力最低, 极

显著低于十二指肠和空肠 ($P < 0.01$), 但十二指肠和空肠之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

培养液 pH 与 LDH 活力之间的线性关系见表 8。pH 5.0~7.0 时, 两者之间呈负相关, 相关性从十二指肠到回肠分别是 0.8756、0.8488 和 0.8242。由于 pH 8.0 时, 培养液中 LDH 活性升高, 因此, 显著降低了 pH 和培养液 LDH 活性之间的负相关性, 因此, pH 5.0~8.0 时, 相关性从十二指肠到回肠分别降到 0.4641、0.3675 和 0.1917。

表 7 不同 pH 培养液中 LDH 活力 (金氏单位¹⁾)

肠 段	pH 值			
	5.0	6.0	7.0	8.0
十二指肠	479.07±31.57 ^{2D}	407.17±33.90 ^C	392.07±29.33 ^{BC}	416.84±22.0 ^C
空 肠	500.20±22.16 ^A	410.79±15.67 ^{BC}	396.90±24.22 ^B	433.15±15.83 ^C
回 肠	366.70±35.41 ^D	300.25±22.34 ^{EF}	288.77±34.57 ^F	331.06±24.01 ^{BE}

1): 金氏单位指每 1000mL 培养液 37℃ 与基质作用 15 min, 在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 个金氏单位^[5]。

2): 同行和同列中具有不同字母者表示极显著 ($P < 0.01$); 相同字母者为差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 8 pH 与酶活力之间的线性关系 (y: 酶活力, x: pH)

肠 段	pH5.0~7.0		pH5.0~8.0	
	线性方程	R ²	线性方程	R ²
十二指肠	$y = -43.50x + 687.10$	0.8756	$y = -20.18x + 554.95$	0.4641
空 肠	$y = -51.65x + 745.86$	0.8488	$y = -21.504x + 575.04$	0.3675
回 肠	$y = -38.97x + 552.36$	0.8242	$y = -11.84x + 398.66$	0.1917

3 讨论

3.1 磷含量对磷吸收的影响 以鼠小肠作为试验模型, 用体外法研究矿物磷的吸收有所报道^[6]。McHardy 等^[7]用大鼠小肠进行体外研究表明, 磷含量对磷吸收有显著影响, pH6.9 时, 磷吸收量随磷含量的增加而增加。本研究结果同样表明, 培养液中磷含量在 0~200 μg/mL 范围内, 磷的吸收量与磷含量之间呈正相关。当磷含量达到 400 μg/mL 时, 十二指肠和空肠肠囊的吸收量极显著低于 200 μg/mL 时的吸收量 ($P < 0.01$), 甚至低于 50 μg/mL 时的吸收量, 但差异不明显 ($P > 0.05$), 这有别于回肠肠囊吸收量的线性增加 (表 1 和表 2); 在一定的范围内, 虽然磷吸收量与培养液磷含量呈正相关, 但是, 由于培养液中磷含量以倍数关系增加, 而磷吸收量的增加较慢, 所以磷的吸收率与培养液中磷含量呈负相关 (表 3 和表 4)。从不同肠段来看, 十二指肠和空肠肠囊对磷

的吸收量极显著高于回肠 ($P < 0.01$)。原因可能有: ①与磷的吸收机理有关。Yan 等^[8]研究报告, II 型 Na-P 协同转运蛋白在鸡的十二指肠和空肠中的表达量较高, 回肠最低。这表明, 磷在十二指肠和空肠前段的吸收机理主要是需要能量和载体、具有饱和性的主动运输以及不需能量但需要游离载体分子、遵从饱和型动力学的促进扩散, 而在回肠中以自由扩散占优势, 在化学势能差的驱动下进行。②十二指肠和空肠肠壁与肠粘膜比回肠厚^[9,10]。试验过程中, 注入相同体积的灌注液时, 回肠肠囊比十二指肠和空肠肠囊表现得更为充盈, 这与试峰^[10]的报道一致。因此, 当培养液中磷含量增加时, 更加容易透过回肠肠壁而进入浆膜腔中。

3.2 pH 对磷吸收的影响 由表 5 可见: 与 pH6.0 和 7.0 相比, pH5.0 时磷的被动扩散和主动吸收均受到极显著抑制 ($P < 0.01$)。与 pH5.0 比较, 在 pH7.0 条件下, 十二指肠、空肠和回肠肠囊的磷摄

入量平均增加 $0.12 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$ 。当培养液 pH 增加到 8.0 时, 各肠段肠囊的磷吸收量开始降低。因此, 培养液 pH 值与肠囊磷吸收量之间呈“ \cap ”型线性关系。这说明鸡小肠钠依赖型磷转运蛋白和被动运输机制对 pH 值具有较强的依赖性。这与 Quamme^[6]用鸡小肠粘膜上皮细胞的试验结果类似, 而与大鼠^[11]、兔^[12]、山羊^[13]和人类^[14]肠道在偏酸性 (pH5.5) 条件下转运量更大相反。原因有: ①肠粘膜细胞活性在 pH6.0~7.0 的环境中最好。细胞活性评价可用乳酸脱氢酶比色法来检测^[5]。比较不同 pH 条件下培养液中 LDH 活力可知, 培养液 pH 在 5.0~7.0 之间时, 随着 pH 的升高, 培养液中 LDH 活力线性降低, 当 pH 继续增加至 8.0 时, 培养液中 LDH 活力开始由降低变为升向高, 由此可知, 培养液 pH 与 LDH 活力之间呈“ \cup ”关系, 因为 pH 过高或过低, 都可以引起细胞碱中毒或酸中毒而死亡破裂。②Na-Pi 转运蛋白对无机磷和 Na^+ 的亲合力在 pH6.0~7.0 时最高^[15]。③可能与磷酸盐种类和磷酸基团的价键形式有关。饲料中无机磷不必经过消化就能以单基取代的、二基取代的和三基取代的磷酸盐形式被吸收^[16]。但是, 不同种类的磷酸盐达到最大溶解度和吸收率所需的酸碱环境各异, 如磷酸钙在弱酸性环境中比在中性或碱性条件下溶解度和吸收率大, 因此, 要避免矿物盐最大溶解度和肠粘膜细胞最佳活性所需酸碱环境之间的矛盾。④可能与 Na-Pi II 型转运蛋白的氨基酸结构有关。Bai 等^[17]和 Graham 等^[18]分别报道, 鼠 Na-Pi II 型转运蛋白中的甘氨酸-天冬酰胺-苏氨酸残基序列和斑马鱼 Na-Pi II 型转运蛋白中的甘氨酸-谷氨酸-苏氨酸残基序列与 pH 的依赖性有关。但还未见有关鸡小肠 Na-Pi II 型转运蛋白氨基酸结构及其与 pH 依赖性之间的报道, 同时, 这种产生依赖性的具体分子机制有待进一步研究。

4 结论

本研究表明, 以生长肉仔鸡小肠为试验材料, 培养液最佳 pH 是 6.0~7.0; 用外翻肠囊法评定饲料有效磷时, 培养液中磷含量不超过 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$, 以 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右较好。

参考文献:

- [1] 张君涛. 蛋鸡离体小肠对二肽吸收转运的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文. 2004.
- [2] 贾斌, 王志祥, 谷新利. 六种中草药添加剂对离体小肠葡萄糖吸

- 收影响的比较[J]. 石河子大学学报(自然科学版). 2003, 7(1):15-18.
- [3] Howard J, Jackson M J, Smyth D H. Intracellular hydrolysis of short chain glycerides by rat small intestine in vitro and transfer of glycerol[J]. The Journal of Physiology, 1970, (208):461-471.
- [4] 盖文婷, 朱连勤, 朱风华. 离体肉鸡小肠对纳米氧化铜吸收速率的研究[J]. 中国饲料, 2008, (9):32-35.
- [5] 洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1):89-92.
- [6] Quamme G A. Phosphate transport in intestinal brush-border membrane vesicles: effect of pH and dietary phosphate[J]. American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiology, 1985, (49):168.
- [7] McHardy G J, Parsons R D S. The absorption of inorganic phosphate from the small intestine of the rat[J]. Q J Experiment Physiology Cogn Medical Science, 1956, (41):398-409.
- [8] Yan F, Angel R, Ashwell C M. Characterization of the Chicken Small Intestine Type IIb Sodium Phosphate Cotransporter[J]. Poultry Science, 2007, 86:67-76.
- [9] 郭航, 王永军, 谢鹏, 等. 日粮添加二氢杨梅素对肉仔鸡肠粘膜形态结构、碱性磷酸酶及生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2008, (6):19-22.
- [10] 计峰. 用体外法和体内法研究有机锰在肉仔鸡小肠中的吸收特点[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2003.
- [11] Lee D B, Walling M W, Corry D B. Phosphorus transport across rat jejunum: Influence of sodium, pH and $1, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ [J]. American Journal of Physiology, 1986, (250):369-373.
- [12] Danisi G, Murer H, Straub R W. Effects of pH and sodium on phosphate transport across brush border membrane vesicles of small intestine[J]. Advance Experiment Medical Biology, 1984, (178):173-180.
- [13] Schroder B, Kappner H, Failing K. Mechanisms of intestinal phosphate transport in small ruminants[J]. British Journal Nutrition, 1995, 74(5):635-648.
- [14] Borowitz S M, Ghishan F K. Phosphate transport in human jejunal brush-border membrane vesicles[J]. Gastroenterology, 1989, 96(1):4-10.
- [15] Shirazi-Beechey S P, Gorvel J P, Beechey R B. Phosphate transport in intestinal brush border membrane[J]. Journal Bioenerg Biomembr, 1988, 20(2):273-288.
- [16] 霍启光. 动物磷营养与磷源[M]. 第一版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002. 13-18.
- [17] Bai L, Collins J F, Ghishan F K. Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine[J]. American Journal Physiology Cell Physiology, 2000, 279(4):1135-1143.
- [18] Graham C, Nalbant P, Scholermann B. Characterization of a type IIb sodium phosphate cotransporter from zebrafish (*Danio rerio*) kidney[J]. American Journal Physiology Renal Physiology, 2003, 284(4):727-736.

樱桃谷鸭白介素 18 基因的克隆与原核表达

龚朋飞, 周庆丰, 苏润环, 周美华, 郑志青
(广东温氏食品集团研究院, 广东 云浮 527400)

摘要: 从鸡新城疫病毒刺激的鸭脾脏淋巴细胞培养液中提取基因组 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增鸭 IL-18 基因, 插入 pMD18-T 载体, 进行序列测定与分析。将成熟鸭 IL-18 基因亚克隆到表达载体 pBCX 中, 并转化入大肠杆菌 *E. coli* BL21 进行表达。测序结果表明, 该基因由 603 个核苷酸组成, 包含一个完整阅读框, 共编码 201 个氨基酸。表达载体经 IPTG 诱导表达出相对分子量约为 59 KD 的融合蛋白。

关键词: 鸭白介素 18 (DuIL-18); 基因克隆; 原核表达

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0028-03

Cloning of Interleukin-18 Mature Protein Gene of Cherry Valley Duck and its Expression in *Escherichia coli*

GONG Peng-fei, ZHOU Qing-feng, SU Run-huan, ZHOU Mei-hua, ZHENG Zhi-qing
(Research Institute of Guangdong WENS Food Group, YunFu, Guangdong 527400, China)

Abstract: Duck Interleukin-18 (DuIL-18) gene was amplified from chicken NDV-stimulated spleen lymphocytes by the method of RT-PCR. The PCR product was cloned into the pMD18-T vector for sequencing and nucleic acid analysis. A prokaryotic expression plasmid, pBCX -ChIL18 was obtained by subcloning the encoding region of the DuIL-18 mature peptide into pBCX. Sequencing analysis showed that the nucleotide sequence of this DuIL-18 mature protein gene was 603bp long, including a complete ORF which encoded 201 amino acids. The recombinant DuIL-18 gene was expressed efficiently in pBCX-DuIL-18 plasmid transformed *Escherichia coli* strain (BL21) after induced by IPTG, the relative molecular weight of the mature peptide protein was approximately 59KD.

Key words: Duck interleukin-18 (DuIL-18); Gene cloning; Prokaryotic expression

白细胞介素 18 (Interleukin-18, IL-18) 是近年来新发现的一种重要的细胞免疫调节因子, 具有多种生物学功能^[1]。IL-18 是一种强有力 IFN- γ 诱导剂, 其生物学活性主要是通过调节 IFN- γ 的表达来提高机体的细胞免疫水平, 发挥预防和控制微生物感染、抑制肿瘤发生的作用^[2]。而且其诱导 IFN- γ 产生的能力比 IL-12 要强得多。它可以直接激活 IFN- γ 的启动子, 促进主要组织相容复合体 MHC-I 蛋白的表达, 因而可作为疫苗的一种重要的免疫佐剂^[3]。

IL-18 作为具有多种免疫调节功能的细胞因子, 自发现以来已经取得了显著的研究成果。目前包括人和鼠等多种动物的 IL-18 基因已被成功克隆, 然而国内关于禽类 IL-18 的研究相对滞后, 且主要集中于鸡的 IL-18^[4,5]。Schneider 等^[6]首次

通过 RT-PCR 方法获得鸡的 IL-18 基因, 并成功进行了表达和活性检测, 证明了 IL-18 具有生物活性。水禽 IL-18 的研究报告更是鲜见, 到目前为止, 仅见在 GenBank 中注册的三个鸭白介素 18 序列, 包括 2 个北京鸭序列和 1 个北京鸭 M2 杂系 IL-18 核苷酸序列。

家禽传染性疾病是养禽业最大的威胁。目前, 多种鸭病毒性疾病如鸭瘟等已给养鸭业造成严重的经济损失。而应用传统疫苗免疫存在诸如应激反应大、或因免疫原性较低而保护率不高等问题。IL-18 作为分子佐剂在疫苗免疫中的促进作用已得到了普遍的认同, 效果显著。为了研究鸭 IL-18 作为分子佐剂在疫苗免疫中的促进作用, 本研究对樱桃谷鸭 IL-18 成熟蛋白的基因进行扩增、克隆和表达, 为 IL-18 的临床应用做好准备工作。

1 材料和方法

1.1 试验材料 成年樱桃谷鸭购自广东某鸭场。AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker (DL2000) 均购自大连宝生物工程有限公司; RNA 抽提试剂 TRIzol LS Reagent 为 Invitrogen 公司产品; DNA 片段凝胶快速回收试剂盒购自 Omega 公司; 其它试剂均为国产分析纯。克隆所用载体 pMD18T 购自大连宝生物工程有限公司, 受体菌 DH5 α 、BL21 由广东温氏食品集团研究院保存。

参照 GenBank 发表的 DuIL-18 参考序列 AF336122.1 设计 1 对引物, 该对引物理论跨幅 603 bp。引物本身不形成发夹结构, 2 条引物间不形成二聚体。引物由大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 合成。引物的核苷酸序列为: 上游引物 (P1): 5' ATGAGATGTGAATTGATGGTTGTG3'; 下游引物 (P2): 5' TCACAGGTTGTACCTTTCATTATG3'。

1.2 RNA 提取及 RT-PCR 扩增 将鸭颈静脉放血致死后可无菌取脾脏, 用灭菌 Hank's 液洗涤 2 次, 加入 10 mL Hank's 液, 用无菌注射器猛烈吹打脾脏得到单细胞悬液。用 RPMI1640 细胞培养液将细胞重新悬浮于细胞培养皿中。将细胞置于含 5%CO₂ 培养箱中, 37℃ 条件下培养。加入刺激物新城疫病毒诱导活化 (新城疫病毒毒株 (NDV-F) 稀释 1:10, 1:100 后接种细胞)。诱导 24 h 后收集淋巴细胞培养物, 4℃ 400 rpm 离心 5 min, 弃上清液, 用 DEPC 水悬浮沉淀, 按 UNIQ010 柱式 Tri-zol 总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA。

取上述 RNA 悬浮液 1 μ L, 加入 1 μ L Oligo (dT)18 作为随机引物, 混合后于 70℃ 温浴 10 min, 置冰上 5 min, 依次加入 5 \times 反转录酶缓冲液 4 μ L, RNA 酶抑制剂 (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 混合物 2 μ L, 混匀并 37℃ 水浴 5 min。最后加 MLVORTase (20 U/ μ L) 1 μ L, 于 42℃ 温浴 60 min, 于 70℃ 15 min 灭活反转录酶, RT 产物立即进行 PCR。

取 2 μ L 反转录产物 cDNA, 25 μ L Premix Ex Taq DNA 聚合酶, 上、下游引物各 1 μ L, 补超纯水至 50 μ L。反应的循环参数为: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。同时设立无模板的阴性对照。反应结束后取 5 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝

胶进行电泳检测 PCR 的结果。经凝胶电泳鉴定为阳性的产物, 用琼脂糖凝胶回收 PCR 产物。

1.3 基因克隆与鉴定 将回收的 PCR 产物与 pMD18T 载体置于 16℃ 水浴 3 h 进行连接, 然后转化 DH5 α 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上培养过夜, 挑取单菌落接种含有 Amp 的 LB 肉汤, 37℃ 振荡培养 12~16 h。提取重组质粒进行 PCR 电泳检测鉴定, 选择 PCR 鉴定为 DuIL-18 全基因重组阳性的质粒, 送大连宝生物工程有限公司进行序列测定。

1.4 表达载体的构建 经过测序分析确定为 DuIL-18 全基因后, 设计了克隆其成熟蛋白基因的一对引物。上游引物 (P1): 5' GCGGAATTCGCTTC-TCTAAGGAAAAAATC3', 含 EcoRI 酶切位点; 下游引物 (P2): 5' GCCCTCGTTACAGGTTGTACCTTCA3', 含 XhoI 酶切位点。扩增出的 DuIL-18 成熟蛋白基因, 经 EcoRI 和 XhoI 双酶切插入原核表达载体 PBCX 的 EcoRI 和 XhoI 酶切位点, 转化受体菌 E. coli DH5a, 筛选出阳性克隆菌株, 经鉴定为阳性的克隆提质粒后转化入受体菌 E. coli BL21, 筛选阳性克隆菌株。

1.5 工程菌的诱导表达 将阳性克隆接种于含 1 mmol 氨苄青霉素的 LB 培养液 37℃ 过夜, 次日将菌液按 5% 接种量接种于 100 mL 上述相同 LB 培养基, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右, 加入最终浓度为 1 mmol 的 IPTG 诱导培养 0 h、2 h、4 h、6 h 后取样 1 mL, 离心收集菌液, 加入 SDS 裂解上样缓冲液, 煮沸 10 min 后, 取上清经 12% SDS-PAGE 电泳分析。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物 从新城疫病毒诱导的鸭脾细胞培养液中分离总 RNA 后, 应用 RT-PCR 方法扩增得到约 600 bp 的 1 条带, 其大小与预期的 DuIL-18 目的片段一致 (图 1)。

2.2 重组质粒的筛选和鉴定 将基因 PCR 产物纯化后克隆于 pMD18T 载体后, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取到 8 个阳性单菌落, 经 PCR 扩增鉴定都有 0.6 kb 左右的特异性条带 (图 2), 得到含有外源基因的阳性重组质粒。

2.3 序列测定 测序报告的 DuIL-18 基因序列见图 3。DuIL-18 基因的全长为 603 bp, 包含一个完整阅读框, 共编码 201 个氨基酸, 表达分子量约

为 23 KD。将得到的 DuIL-18 基因序列与 GenBank 上发表的 3 条鸭 IL-18 基因序列进行比较分析发现, 克隆的 DuIL-18 基因序列与 DQ490137.1、DQ522948.1、AF336122.1 的序列完全一致。

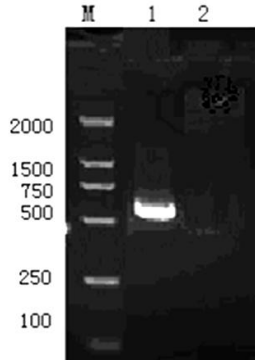


图 1 RT-PCR 产物电泳图

M: DL2000 DNA marker; 1 RT-PCR 产物; 2 阴性对照

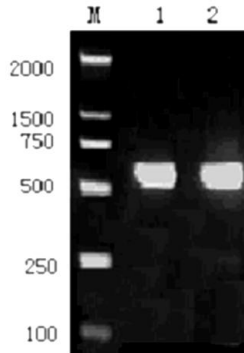


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定

M: DL2000 DNA Marker 1, 2: 重组质粒 PCR 产物

```

1  ATGAGATGTAATTGATGGTTGTGTGTGCAGTACAGCTTGGAGAGAACCTCTGCCTCTAT
   M R C E L M V V C A V Q L G E N L C L Y
61  TTTGCTGATGACGATGAGCTGGAATGTGATGCCCTTCTCTAAGGAAAAACCCCTCCATCGC
   F A D D D E L E C D A F S K E K T L H R
121 TTCCTTCGGAATGTAATAGCCAGGTGCTTGTGGTCCAGCCAGATCTGAACATGGCAGCT
   F L R N V N S Q V L V V Q P D L N M A A
181 TTTGAAGATGTAACAGATCAGGAGATGAAATCTGGCAGCGGAATGAACTTCTGCATGCAC
   F E D V T D Q E M K S G S G M N F C M H
241 TGTACAAAACCTACCACCTTCAGCAGGATGCCTGTTGCATTGATGTCCTCCGGTAGAA
   C Y K T T T P S A G M P V A F S V R V E
301 GATAAAAGCTACTACATGTTGTGAGGAAGAACACGGGAAAATGATAGTTCGATTAGG
   D K S Y Y M C C E E E H G K M I V R F R
361 GAAGGAGAAGTCCCAAGACATTCCTGGTGAAGCAACATCATCTTCTTCAAAAAGACA
   E G E V P K D I P G E S N I I F F K K T
421 TTTACATCTTACAGCTCCAAGCCATTTAAGTTTGAATACTACTAGAACGAGGGATGTT
   F T S Y S S K A F K F E Y S L E R G M F
481 CTGGCCTTTGAGGAAGAAGACTCCTTAAGAAAATAATTTTAAAGAACTGCCAAGAGAA
   L A F E E E D S L R K L I L K K L P R E
541 GATGAGGTAGATGAAACACAAAGATAACTTTAACAAGTCATAATGAAAGGTACAACCTG
   D E V D E T T K I T L T S H N E R Y N L
601 TGA
-

```

图 3 DuIL-18 基因序列与推导氨基酸序列

2.4 目的蛋白的初步表达 将 DuIL-18 成熟蛋白基因插入原核表达载体 PBCX 后, 转入感受菌 BL21, 挑取单菌落经 PCR 鉴定为阳性克隆菌, 用 IPTG 诱导表达 6 h, 经 SDS-PAGE 电泳后, 可见一条分子量约 59 KD 的条带, 与预期结果相符 (图 4)。

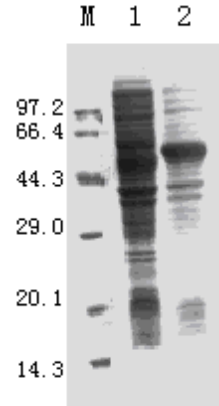


图 4 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

M: 低分子量标准蛋白; 1: 阴性对照; 2: 诱导表达 4h 表达产物

3 讨论

本文所用表达载体为 PBCX 载体, 为华南农业大学构建的高效表达可溶性蛋白载体。本实验中 PBCX 空载体表达蛋白的分子量约为 36 KD, 而 DuIL-18 表达蛋白分子量约为 23 KD, 故表达蛋白产物电泳结果为 59 KD, 与预期结果相符。

目前, 鸭病毒性疾病如番鸭细小病毒病、鸭病毒性肝炎、鸭瘟等给养鸭业造成严重的经济损失。应用传统疫苗免疫存在较多问题, 如弱毒疫苗潜在的安全问题, 灭活疫苗虽然安全有效, 但免疫效力尤其细胞免疫作用受到限制。基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗虽具有应用潜力, 但仍需提高其免疫, 尤其细胞免疫效果。IL-18 是一种强有力的 IFN- γ 诱导剂, 其生物学活性主要通过调节 IFN- γ 的表达来提高机体的细胞免疫水平。因此, IL-18 可望成为疫苗的一种重要的细胞免疫佐剂, 在提高机体抗感染力、增强灭活苗或基因工程苗免疫作用方面具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 陈开森. IL-18 生物学作用研究进展[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2004, (04):10.
 [2] Kikuchi T, Akasaki Y, Joki T, et al. Antitumor activity

(下转第 37 页)

猪源流感病毒 NS1 基因的克隆及原核表达

李敏^{1,2}, 向华², 宣华², 蔡建平², 王贵平²

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 对 H₃N₂ 亚型猪流感病毒 NS1 基因进行原核表达, 获得纯化表达产物, 以期为检测猪流感抗体的 ELISA 试剂盒的研制奠定基础。采用 RT-PCR 方法扩增 H₃N₂ 亚型猪源流感病毒的 NS1 基因 (693 bp), 并将该片段克隆至 pET-28(a) 构建重组表达质粒 pET-NS1。将重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 以终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 在不同时间进行诱导表达, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 并经 Western-blot 分析表达产物的抗原性。pET-NS1 重组表达质粒表达的 NS1 蛋白相对分子质量约为 26 kD, 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 时蛋白表达量达到高峰。Western-blot 印迹分析证实表达蛋白能与阳性血清发生特异性反应, 而与阴性血清不反应。NS1 基因的原核表达产物可用于鉴别流感感染猪群和灭活疫苗免疫猪群。

关键词: 猪流感病毒; H₃N₂; NS1; 原核表达

中图分类号: 814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0031-04

Cloning and Prokaryotic Expression of NS1 Gene of H3N2 Swine Influenza Virus

Li Min^{1,3}, Xiang Hua², Xuan Hua^{2,3}, Cai Jian-ping², Wang Gui-ping²

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China; 2. Institute of Veterinary Medicine Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The NS1 gene of H3N2 subtype influenza A virus was expressed in prokaryotic expression system to obtain the recombinant protein for the manufacture of ELISA detection kit for swine influenza virus. The NS1 gene of one H3N2 subtype swine influenza A virus was amplified by RT-PCR, and then cloned into prokaryotic expression vector pET-28a(+). The recombinant plasmid pET-NS1 was extracted after being transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells and was induced expression for NS1 gene with 1 mmol/L IPTG at different times. The protein expression was assayed with SDS-PAGE and the protein immunity was analyzed by Western-blot. The NS1 protein with relative molecular weight of approximately 26 kD could be highly expressed. The western-blot test showed that the recombinant protein could react with the positive sera, but not with the negative sera. The protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) could be applied to discriminate the influenza infected pigs from the vaccinated ones.

Key words: Swine influenza virus; H3N2 subtype; NS1; prokaryotic expression

猪流感是目前危害全世界养猪业的重要呼吸道疾病之一。猪流感病毒感染能引起患猪死亡, 生产性能下降, 肉料比降低, 直接影响猪群健康状况和产品质量, 对养猪业危害很大^[1,2]。由于猪流感在禽流感和人流感的流行、传播和分子变异中的特殊作用, 它对公共卫生也具有十分重要的意义^[3]。

虽然一些猪场使用灭活疫苗在一定程度上控制了猪流感的流行, 但灭活疫苗的接种会对免疫猪和自然感染猪的鉴别诊断造成障碍, 影响疫苗

的监测。因此, 建立一种可以鉴别诊断猪流感人工免疫与自然感染的方法已成为当务之急^[4]。现有研究表明, 非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染机体的一个重要标记。流感病毒感染猪体内产生猪流感病毒结构蛋白抗体和非结构蛋白抗体, 而免疫猪体内主要产生结构蛋白抗体。利用这种抗体差异, 可用非结构蛋白区分免疫猪群与野毒感染猪群^[5-7]。本研究利用猪流感病毒非结构蛋白 NS1 基因, 建立可区分免疫猪群与野毒感染猪群

的快速鉴别诊断方法, 为养猪业的稳定发展和人类健康, 为最终控制和消灭这种疾病提供可靠依据和技术保证。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株 原核表达载体 pET-28a (+) 由广东省农业科学院兽医研究所实验室保存; 菌株 *E. coli* JM109、BL21 (DE3) 均由广东省农科院兽医研究所实验室保存。猪源流感病毒株为: A/Swine/Guangdong/01/2004 (H₃N₂)。

1.2 主要试剂 Trizol RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司; 凝胶回收试剂盒购自安徽优品生物公司; 小量质粒提取试剂盒购自博大泰克生物有限公司; 限制性内切酶 *SalI* 和 *XhoI* 购自 Takara 公司。

1.3 引物设计 根据 Genbank 公布的 H₃N₂ 亚型猪源流感病毒 NS1 蛋白全基因序列, 应用 DNASTAR 引物设计软件, 设计并合成了一对特异性引物, 并分别在上游与下游引物加上 *SalI* 和 *XhoI* 酶切位点:

P1: 5' -CAGTCGACATGGATTCCAACACT-3'

P2: 5' -AGCTCGAGTCAAACCTTTTGACCT-3'

将该引物送上海英俊生物技术有限公司合成。

1.4 病毒增殖 将猪源流感毒 A/Swine/Guangdong/01/2004 接种于 9~11 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 37℃ 孵育, 收集 24~96 h 鸡胚尿囊液, 冻存储备用。

1.5 RNA 提取 按照 Trizol RNA 抽提试剂盒说明书进行, 从鸡胚尿囊液中提取病毒 RNA, 所用器皿和试剂经 DEPC 水处理。

1.6 RT-PCR 及产物鉴定 按照 AMV 反转录酶试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 40s, 58℃ 40s, 72℃ 90s, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将鉴定正确的扩增产物经凝胶回收纯化后与 PMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* JM109 感受态, 经蓝白斑筛选阳性菌, 提取重组质粒送上海英俊生物技术有限公司测序, 阳性重组质粒命名为 PMD-NS1。

1.7 表达载体的构建 以 PMD-NS1 质粒为模板, 用 *SalI* 和 *XhoI* 双酶切获得 NS1 片段, 将 NS1 片段与经 *SalI* 和 *XhoI* 双酶切的 pET-28a (+) 载体用 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 连接产物转化

E. coli BL21 (DE3), 获得含目的片段的阳性重组质粒命名为 pET-NS1, 并对重组质粒进行 PCR 和酶切鉴定。

1.8 重组蛋白的表达 将阳性克隆接种于 LB 液体培养基 (含 50 U/mL 卡那霉素), 以终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 分别于 0、1、2、4、6 h 收集菌体, 经 12% SDS-PAGE 电泳检测表达蛋白。

1.9 表达产物的纯化和 West-blot 分析 按照 His Bind Purification Kit 说明书进行表达产物的纯化, 按文献^[8]介绍的 Western-blot 方法分析表达产物。

2 结果与分析

2.1 NS1 基因的扩增 提取病毒 RNA 后反转录得到 cDNA, PCR 扩增得到 NS1 基因。经电泳鉴定 NS1 基因约为 700 bp (图 1), 与预期片段大小相符。测序结果表明该病毒株 NS1 基因核苷酸序列长度为 693 bp。

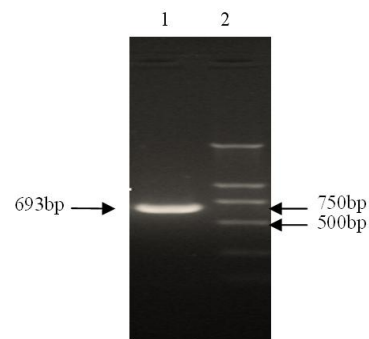


图 1 NS1 基因片段 PCR 扩增结果

1. PCR 扩增产物; 2. 标准分子量 DL2000

2.2 表达载体 PET-NS1 的鉴定 用 P1、P2 引物对表达载体 PET-NS1 重组质粒进行 PCR 鉴定, 电泳后可见一条约 700 bp 的目的条带 (图 2); 用 *SalI* 和 *XhoI* 限制性内切酶对 PET-NS1 重组质粒进行酶切验证, 电泳后可见一条约 5.3 kb 的表达载体 pET-28a (+) 条带和一条约 700 bp 目的条带 (图 3), 与预期结果一致。

2.3 NS1 基因表达及重组蛋白的纯化 见图 4。SDS-PAGE 结果表明: 在终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h 后重组蛋白表达量达到高峰, 目的蛋白大小约为 26 kD。并用 Ni-NTA 对所表达蛋白进行纯化。

2.4 重组表达蛋白 Western-blot 检测 重组蛋白 NS1 纯化后 (图 5), 经电转移后, 可与由流感

病毒感染而获得的阳性血清发生反应, 显色后出现清晰特异性条带, 而与从免疫灭活疫苗的猪所获得的 NS1 血清不发生反应(图 6)。

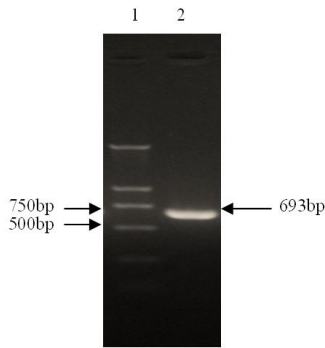


图 2 表达载体 PET-NS1 的 PCR 鉴定

1. DL2000; 2. PCR 扩增产物

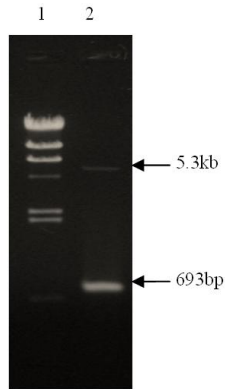


图 3 表达载体 PET-NS1 的酶切鉴定

1. DL15000 2. SaII 和 XhoI 酶切片段

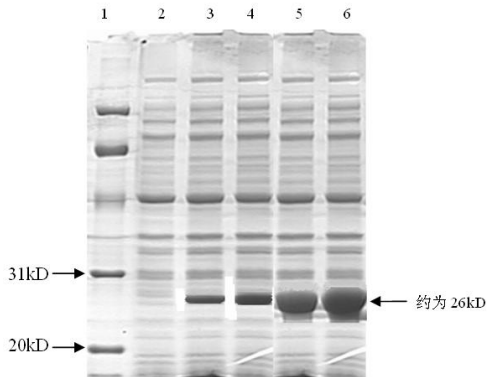


图 4 NS1 重组蛋白不同诱导时间 SDS-PAGE 检测

1. 蛋白标准分子量 Maker; 2. 未经诱导的蛋白表达;
3-6. 诱导时间分别为 1h、2h、4h、6h 的蛋白表达

3 讨论

NS 基因编码非结构蛋白, 其基因长 890 个核苷酸, 有 2 个开放读框, 可编码 NS1 和 NS2 两种蛋白, 这两种蛋白大量存在于感染细胞中。在感染的

早期, 可发现细胞核内有大量 NS1 蛋白存在, 在感染晚期, NS1 蛋白可以在细胞浆中出现, 而 NS2 在后期才会合成产生^[9,10]。作为病毒的非结构成分, NS1 蛋白的出现仅仅局限在病毒感染期, 可刺激机体产生非结构蛋白抗体。因此, 针对 NS1 蛋白的抗体只可能出现在病毒感染群中。灭活疫苗在猪流感预防与防治中发挥了巨大的作用, 但也为感染猪只的检测造成了一定的困难。流感病毒感染后在猪体内复制、增殖, 这一过程需要流感病毒非结构蛋白的参与。但是灭活疫苗免疫后, 理论上没有非结构蛋白抗体的产生, 因此, 非结构蛋白(NS1) 及其抗体可作为活流感病毒感染机体的一个重要标记而区分流感病毒自然感染猪群和灭活疫苗免疫猪群^[11,12]。本研究成功地将 A/Swine/Guangdong/01/2004 流感病毒的 NS1 基因在大肠杆菌中进行了高效表达。

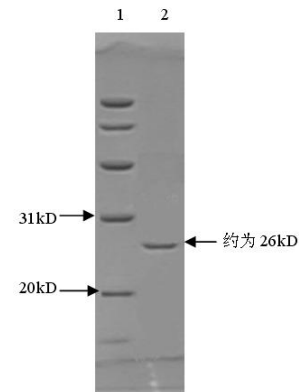


图 5 NS1 重组蛋白的纯化

1. 蛋白标准分子量 Maker; 2. 经镍柱纯化后的 NS1 蛋白

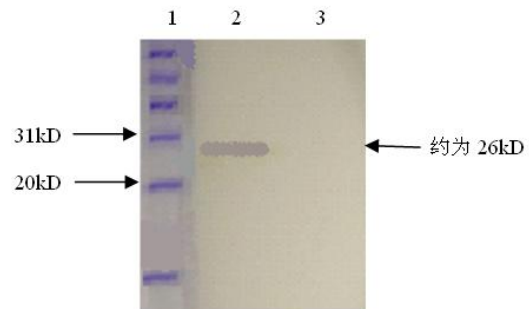


图 6 表达产物的 Western-blot 结果

1. 蛋白标准分子量 Maker; 2. 表达蛋白与阳性血清反应; 3. 表达蛋白与阴性血清反应

本研究选用 pET 原核表达系统, NS1 蛋白基因受噬菌体 T7 强转录及翻译信号控制, 在大肠杆菌中得到大量表达, 表达蛋白含量可达到细菌总

蛋白量的 37.4%。pET 表达系统所表达的蛋白带有 His Tag 标签, 可以使用亲和层析方法方便的纯化表达蛋白, 纯化后的目的蛋白含量高达 95%。本试验用不同浓度 IPTG, 在不同时间对 NS1 蛋白进行诱导表达, 结果表明用 1mmol/L 的 IPTG 诱导 4 小时时蛋白表达量达到高峰。对 NS1 表达蛋白进行 Western-blot 分析表明, NS1 重组蛋白具有良好的免疫反应原性。这为下一步建立区分自然感染与灭活疫苗免疫动物鉴别诊断的 ELISA 抗体诊断试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] 斯特劳, 阿莱尔, 蒙加林, 等. 猪病学[M]. 第八版. 赵德明, 张中秋, 沈建忠译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000. 545-549.
- [2] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 猪流感的世界流行及公共卫生[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002, 12: 48-49.
- [3] 蔡明, 黄希庆, 刘学汉, 等. 猪呼吸道疾病综合征的防制[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(3): 55-57.
- [4] 王方昆, 袁秀芳, 王一成, 等. H₃N₂ 亚型猪流感病毒 NS1 基因的克隆表达及反应原性分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 587-592.
- [5] 刘金华, 吴清民, 史为民, 等. H₃N₂ 亚型禽流感病毒非结构蛋白 NS 基因的克隆与表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18(5): 503-505.
- [6] 赵思婷, 王贵华, 张瑞华, 等. 鸭源 H₃N₂ 亚型流感病毒 NS 基因的克隆及表达[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(5): 23-26.
- [7] 段廷云, 桑传印, 李艳伍. 猪流感分子流行病学及免疫预防研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 43-46.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指导[M]. 第 2 版. 金东雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1996. 880-898.
- [9] Guan Y, Peiris J S, Kong K F, et al. H₃N₁ influenza virus isolated from geese in southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks[J]. Virology, 2002, 292(1): 16-23.
- [10] Wang S, Shi W M, Mweene A. Genetic analysis of the non-structural (NS) genes of H₃N₂ chicken influenza viruses isolated in China during 1998-2002[J]. Virus Genes, 2005, 31(3): 329-335.
- [11] 孙进华, 于志丹, 曲哲会, 等. 两株不同亚型禽流感病毒 NS1 基因的表达及抗原性检测[J]. 中国动物检疫, 2006, 23(9): 28-30.
- [12] Ozald H, Sugiura T, Sugita S, et al. Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses[J]. Vet Microbiol, 2001, 82(2): 111-119.

(上接第 22 页)

中, 形成腹水, 发为鼓胀; 病久累积肾脏, 则水浊雍结更甚, 使病入险境。肝气郁滞, 血脉瘀阻, 水湿内停, 是形成鼓症的三个重要环节。我们自拟的方剂具有利水消肿、活血化淤、消食健脾和胃、疏肝理气、运脾利湿、行气止痛等功效, 对黑熊肝硬化继发腹水(鼓症)有良好的治疗调理作用。

7.2 针对黑熊肝硬化后出现黄疸的特点, 我们选用了甘利欣、茵栀黄注射液、黄芪注射液进行联合治疗。其中, 甘利欣具有明显的退黄和降转氨酶作用^[3], 并具有保护肝细胞膜、抗纤维化作用^[4]; 茵栀黄在辅助退黄方面有良好效果^[5], 还具有改善肝功能的作用; 黄芪注射液具有利胆退黄、提高免疫力、抗病毒、抗纤维化等作用^[6-8]。三者联合应用于黑熊肝硬化继发腹水的治疗, 起到了很好的退黄消胀、抗肝纤维化和改善肝功能的作用。

7.3 实验室检查显示, 患熊多数出现细菌感染, 头孢氨苄、头孢噻肟钠与丁胺卡那霉素等抗菌药物对感染菌均有良好的杀菌作用。考虑到头孢类药物和

氨基糖苷类药物有协同杀菌作用, 我们联合应用这两类药物进行为期 10~15 天的抗感染治疗, 患熊的胆囊炎等症状得到明显改善。

参考文献:

- [1] [http://www.worldzoo.org/International Species Information System/INTPages/84908025.HTM](http://www.worldzoo.org/International%20Species%20Information%20System/INTPages/84908025.HTM)
- [2] 刘平. 现代中医肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 161-163.
- [3] 齐玉华, 孟泊湖. 甘利欣对慢性肝炎的退黄作用的疗效观察[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(2): 11-13.
- [4] 章以法, 王林伦, 尹蔚华. 甘利欣联合丹参抗肝纤维化的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(7): 6-8.
- [5] 郭豫坚. 茵栀黄佐治新生儿高胆红素血症的临床观察[J]. 中华现代儿科学杂志, 2004, 1(1): 23-24.
- [6] 刘碧坚, 夏冬文. 黄芪注射液治疗急性黄疸型肝炎的临床评价[J]. 辽宁药物与临床, 2003, 3(1): 36-38.
- [7] 王要军, 权启镇, 孙百勤, 等. 黄芪对实验性肝纤维化组织 I CAM-1 表达影响的免疫化研究[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 2000, 5(1): 21-23.
- [8] 曹文义, 张淑芬, 李晓冬, 等. 复方黄芪煎剂治疗胆纤维化疗效观察[J]. 医学纵横, 2001, 15(1): 43-44.

圆环病毒 2 型人工感染猪的排毒情况及体内分布规律的初步研究

何逸民¹, 罗玉均¹, 冯春复², 阳 燕³, 何兆祥³, 张桂红^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 湖南益阳市赫山区畜牧水产局, 湖南 益阳 413002)

摘要: 猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 是引起断奶仔猪多系统衰竭综合症 (PMWS) 的重要病原, 它给养猪业带来巨大的经济损失。本研究利用 PCR 及荧光定量 PCR 检测猪人工感染猪圆环病毒 2 型后的排毒及体内分布规律。结果表明, 感染猪可以通过呼吸道和消化道进行排毒, 而且病毒持续存在; PCV2 病毒主要存在于病猪的淋巴结、肾脏、肺脏中, 在肝脏和脾脏中也少量存在。

关键词: 人工感染; 猪圆环病毒 2 型; 体外排毒; 体内分布

中图分类号: S852.659.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2009)02-0035-03

Virus Shed and Virus Distribution in Artificial Challenge Pigs with Porcine Circovirus type 2

HE Yi-min¹, LUO Yu-jun¹, Feng Chun-fu², YANG Yan³, HE Zhao-xiang³, ZHANG Gui-hong¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510624, China; 2. Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin, Heilongjiang, 15000, China; 3. Animal Husbandry and Fishery Bureau of Heshan district, Yiyang, Hunan 413002, China)

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the main pathogen of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine, which caused enormous economic loss. In this study, the distribution of PCV2 in pigs after artificial challenge was detected by the method of PCR and real-time PCR. The results showed that the sick pigs persistently shed virus by respiratory tracts and digestive tracts post infection, and the virus was mainly resided in lymph node, kidney, lung, and slightly in liver and spleen. In this research, the invasion mechanism was initial defined, and the theory for the diagnosis and treatment of PCV2 disease was provided.

Key words: Artificial challenge; porcine circovirus type 2; virus shed; in vivo distribution

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 是迄今发现的一种最小的动物病毒, 分为 PCV1 和 PCV2 二型^[1]。PCV2 是仔猪断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS) 的主要致病病原, 它的发生和流行已经给世界养猪业造成了巨大的经济损失。现已确定, PCV2 感染是导致 PMWS 的先决条件。事实上, 在 PMWS 患猪体内总能发现大量 PCV2 抗原或核酸, 但猪血清中有 PCV2 抗体并不一定会发生 PMWS。对病毒的定量分析发现, 发病猪体内病毒感染的细胞数量似乎总是高于带毒猪相应细胞的感染数量。研究表明猪体内的 PCV2 病毒含量只有达到一定数量后才表现出临床症状。

本研究采取对健康仔猪接种 PCV2 的方法, 建立人工感染模型, 进一步明确 PCV2 感染猪的主要

免疫器官及部分内脏器官的病理学变化、排毒情况以及病毒分布规律, 为 PCV2 感染的诊断、防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 PCV2-HLJ1 株由华南农业大学禽病研究室分离保存。28 d 健康杜长大三元杂猪购自花都梯面猪场, 实验前检测 PCV2 抗体为阴性。Go Taq Green Master Mix 和 DNA 提取试剂盒分别购于 PROMEGA 公司和上海生工生物工程技术服务有限公司; Real-time PCR Premix 购于宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCV2-HLJ1 株对猪的人工感染 将 10 头 4 周龄猪随机分为 2 组, 每组 5 头, 分别为 PCV2

组和空白对照组。PCV2 组攻毒接种 PCV2-HLJ1 细胞毒 4 mL/头(滴鼻、肌注各 2 mL)。空白对照组注射无 PCV2 的细胞培养液 4 mL/头(滴鼻、肌注各 2 mL)。

1.2.2 用 PCR 法与荧光定量 PCR 法检测排毒情况 分别于攻毒前和攻毒后 7 d、14 d、21 d、28 d 对各组采鼻拭子和肛拭子,提取病毒 DNA,并分别用于 PCR 与荧光定量 PCR 检测 PCV2。PCR 反应总体积为 20 μ L,其中 Go Taq Green Master Mix 10 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,模板 2 μ L,用灭菌 DEPC 水补足,均匀混合。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40s,29 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 6min,12 $^{\circ}$ C 保存。荧光定量 PCR 反应总体积为 25 μ L,其中 Real-time PCR Premix 12.5 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,模板 2 μ L,用灭菌 DEPC 水补足,均匀混合;扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 1min;95 $^{\circ}$ C 变性 15s,58.5 $^{\circ}$ C 退火 15s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20s,83 $^{\circ}$ C 检测荧光,进行 40 个循环后进行熔解曲线分析,由 95 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C 1min,60 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C 1min 结束。

1.2.3 PCR 检测 PCV2 在体内的分布规律 将保存于 -20 $^{\circ}$ C 灭菌的 Eppendorf 管中各感染猪的组织样品,每份组织各加入 500 μ L 灭菌生理盐水溶液,将组织充分研磨,反复冻融两次,使组织细胞

破裂,病毒粒子充分释放到生理盐水溶液中。取 200 μ L 上清抽提 DNA,随后用普通 PCR 进行检测,试验结束后记录并统计试验结果。

2 结果

2.1 PCV2 人工感染猪的临床症状、剖检病理变化 PCV2 人工感染猪后可见部分猪精神沉郁,但未见有其他明显症状,攻毒 7d 个别猪体温达 40.1 $^{\circ}$ C,而攻毒 10 d 后有 1 头猪死亡,剖检大体病理变化主要可见猪下颌淋巴结肿大,肠系膜淋巴结肿大(图 1、图 2),有间质性肺炎(图 3)。而实验对照组正常(图 4)。

2.2 荧光定量 PCR 法检测 PCV2 感染猪的排毒动态 分别于试验 7 d、14 d、21 d、28 d 对各组猪进行采鼻拭子和肛拭子,用 PCR 与荧光定量 PCR 检测猪 PCV2 体外排毒情况。从表 1 中可以看出,猪感染 PCV2 后 7 d 至 28 d 可检测到 PCV2 病毒,检测结果表明 PCV2 可以通过呼吸道和消化道进行排毒,而且病毒持续存在,表现为无规律排毒。

2.3 PCR 法检测 PCV2 感染猪组织样品 结果表明利用建立的 PCR 方法对 PCV2 感染猪的内脏组织中存在的 PCV2 病毒进行检测(表 2、图 5),结果发现 PCV2 病毒主要存在于病猪的淋巴结、肾脏、肺脏中,在肝脏和脾脏中少量存在。



图 1 PCV2 组猪下颌淋巴结轻微肿大

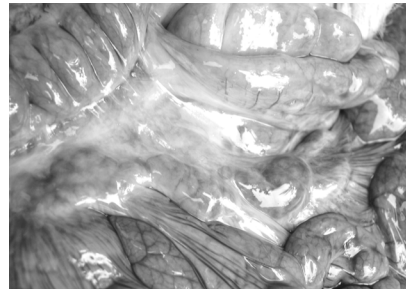


图 2 PCV2 组猪肠系膜淋巴结肿大、出血

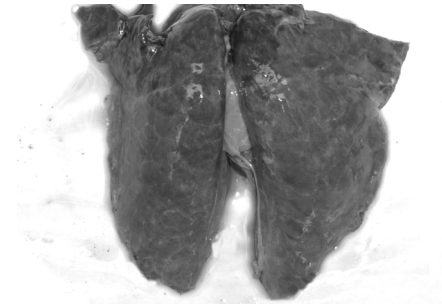


图 3 PCV2 组猪间质性肺炎

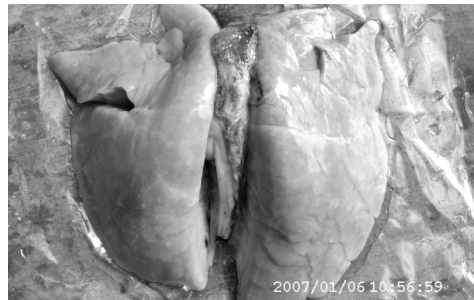


图 4 对照组 正常猪肺脏

表 1 荧光定量 PCR 检测猪 PCV2 体外排毒情况

时间组别	7d		14d		21d		28d	
	鼻拭子	肛拭子	鼻拭子	肛拭子	鼻拭子	肛拭子	鼻拭子	肛拭子
PCV2 组	- ¹⁾ (32.95) ²⁾	+(22.80)	-(34.31)	-(34.40)	+(24.37)	-(N)	+(24.37)	+(21.01)
对照组	-(0)	-(0)	-(0)	-(34.15)	-(34.70)	-(34.60)	-(0)	-(0)

1): “-”表示 PCR 结果阴性, “+”表示 PCR 结果阳性, “N”表示未检测。
2): 扩号内 Ct 值为荧光定量 PCR 检测结果 (Ct 值 ≥ 30 判为阴性)

表 2 PCR 检测 PCV2 感染猪组织样品结果

组别	心	肝	脾	肾	肺	腹股沟淋巴结	下颌淋巴结	胸腺
PCV2 (n=3)	2/3 ¹⁾	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/1

1): 表示阳性率 = 阳性个数 / 样品总数

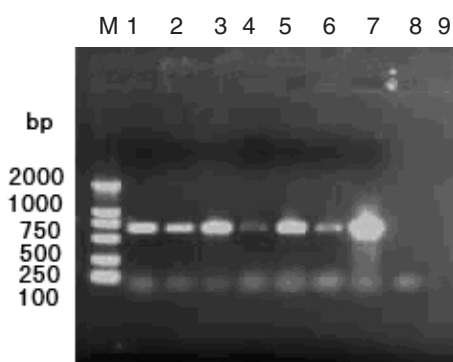


图 5 PCR 检测 PCV2 感染猪组织样品

M:Marker DL 2000; 1:心; 2:肺; 3:肝; 4:肾; 5:脾; 6: 下颌淋巴结; 7:腹股沟淋巴结; 8:胸腺; 9:以 H₂O 为模板的阴性对照。

3 小结与讨论

猪感染 PCV2 后仅有个别猪出现发烧, 感染 PCV2 的猪可以通过呼吸道和消化道进行排毒, 而且病毒持续存在, 表现为无规律排毒。利用 PCR

方法对 PCV2 感染猪的内脏组织进行 PCV2 病毒检测, 结果发现 PCV2 病毒主要存在于病猪的淋巴结、肾脏和肺脏等组织中, 在肝脏和脾脏中少量存在。

Rosell 等^[2]从慢性经过死亡的 2 个病例的病理变化发现, PCV2 从猪的鼻、口腔侵入体内, 在扁桃体、局部淋巴结增殖后, 向其他淋巴组织、肺、肝、肾传播。由于 PCV2 慢性感染的影响, 从而诱发免疫抑制、肠炎、间质性肾炎及肝损伤等病理变化。

参考文献:

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社. 1997.
[2] Rosell C, Segalé s J, Domingo M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2[J]. Vet Pathol. 2000, 37(6):687-692.

(上接第 30 页)

of interleukin-18 on mouse glioma cells[J]. J Immunotherapy, 2000, 23(2):184-189.
[3] Akhiani A A, Schon K, Lycke N. Vaccine-Induced Immunity against Helicobacter pylori Infection Is Impaired in IL-18-Deficient Mice[J]. J Immunol, 2004, 173: 3348-3356
[4] 李蕾, 王润田, 扬永杰, 等. 模拟 IL-18 天然生成真核表达系统的构建及生物活性初探[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(12):964-968.
[5] 温纳相, 黄青云, 陈金顶, 等. 鸡 IL-18 基因的克隆与序列测定[J]. 动物医学进展, 2003, (02):64-66.
[6] Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, et al. cDNA cloning

of biologically active chicken interleukin-18[J]. The Journal of General Virology, 2000, 20(10):879-883.
[7] Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, et al. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection[J]. J Virol, 1999, 73:2401-2409.
[8] Kawakami, T, Zhang, H, Okamura, et al. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with Cryptococcus neoformans by inducing IFN-γ production[J]. J Immunol, 1997, (159):5528.
[9] 霍冬梅, 廖蕴华. 白细胞介素-18 与肾脏疾病研究进展[J]. 中国医学文摘(内科学); 2006, (1):17-19.
[10] 胡迎东, 沈国顺, 白红光. 白细胞介素 18 与有关疾病的研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2005, (11):43-45.

复方长效土霉素注射液的工艺研究及疗效试验

朱 斌¹, 李龙瑞^{2*}

(1. 赣州市利华兽药有限公司, 江西 赣州 341108; 2. 江西核工业天地和药业有限公司, 江西 南昌 330029)

摘要: 改变原长效土霉素注射液的处方和溶解条件, 加入适量的增效剂、抗原虫药、解热镇痛药和核心料, 并调整了常规的生产工艺。结果表明, 改进后的复方长效土霉素注射液, 其稳定性能与进口长效土霉素注射液相近, 疗效上则好于进口长效土霉素注射液。本产品经 100℃、30 min 流通蒸汽灭菌, 未见颜色变化, 经微生物效价测得其相对含量与灭菌前差异不显著 ($P > 0.05$)。最终结果表明, 本产品的小试工艺稳定, 但进行规模化生产还必须进一步对工艺进行研究。

关键词: 复方长效土霉素注射液; 长效土霉素注射液; 制备工艺

中图分类号: S859.799.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2009)02-0038-02

土霉素为四环素类广谱抗菌药, 由链霉菌 *Streptomyces rimosus* 所产生, 制品为盐酸盐。土霉素碱因口服吸收少, 且含较多量差向化合物, 已不再口服使用, 现普遍使用土霉素注射液。美国 Pfizer 公司最早开发出长效土霉素注射液, 其商品名为“得米先”。近几年来国内也成功研制出长效土霉素注射液, 并且被《中华人民共和国兽药质量标准》2003 年版收载。

土霉素碱微溶于水, 可溶于甲醇、乙醇、丙酮及丙二醇, 在空气中较稳定, 但其制剂在酸性或碱性条件下, 遇热或长时间存放均易变色或沉淀、甚至变成黑色, 致效价降低。这是因为土霉素的水溶液通过差向异构反应、脱水反应、水解反应及氧化反应分解。在酸性条件下 C_6 上的羟基与 C_{5a} 上的氢发生反式消去反应, 会生产橙黄色脱水物; 而在碱性条件下则生成内脂结构的异构体, 会变成暗黑色或黑色。当 pH 值为 2.0 左右时, 土霉素注射液在 0℃ 时能保存 30 d 左右, pH 值为 8.5 时, 只能保存 7 d 左右, 而药典规定的 pH 值范围则在 8.0~9.0。这对大多生产厂家是个很大的困扰。笔者所研制的复方长效土霉素注射液, 在原土霉素注射液的基础上溶入了增效剂、抗原虫药及解热镇痛药等, 不仅产品质量稳定, 同时也提高了药效。

1 材料

1.1 试剂与药物 土霉素碱: 效价为 934 IU/mg, 河北华曙制药股份有限公司生产。三氮脒: 为进口产品, 由上海中威实业有限公司提供。对乙酰氨基酚: 安徽佳盟山河药业有限公司提供。二甲氧嘧啶: 由广东北沙药业有限公司提供。溶剂及辅料: 南昌

华亨试剂供应站供应, 系分析纯。以上原料药都经赣州市利华兽药有限公司质检部检验为合格产品。

1.2 仪器设备 自制反应锅、高效过滤器、安瓿拉丝灌封机、高压灭菌柜、ZY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪 (北京先驱威锋技术开发公司生产)、pHS-3C+ 酸度计 (成都市方舟科技开发有限公司生产)、YB-2 型澄明度检测仪 (天津大学精密仪器厂生产)、恒温培养箱。

2 方法

2.1 制备方法

2.1.1 处方 土霉素碱 21.5 g、二甲氧嘧啶 4 g、三氮脒 2 g、对乙酰氨基酚 8 g、 α -吡咯烷酮 30 mL、丙二醇 30 mL、乙醇 10 mL、氯化镁 3 g、乙醇胺 5 mL (约)、硫代硫酸钠 0.2 g。水加至 100 mL。

2.1.2 工艺 A 液: 取水 10 mL, 加入氯化镁, 再加入硫代硫酸钠使溶解, 加入土霉素碱, 搅成混悬, 用处方量的乙醇胺调 pH 至 8.0 左右, 迅速加入处方量的 α -吡咯烷酮。B 液: 取处方量的丙二醇、乙醇组成的混合溶媒, 加热至 70℃, 依次加入二甲嘧啶、三氮脒及对乙酰氨基酚溶解而成。混合 A、B 二液, 搅拌均匀, 缓慢加入乙醇胺溶液渐渐澄清, 调 pH 值至 8.5~9.0。加水至全量, 灌封, 100℃ 灭菌 30 min。

2.1.3 效价测定 土霉素的效价测定参照《中华人民共和国兽药典》(2005 年版) 一部附录第 103 页记载的抗生素微生物检定法精细测定。

2.2 稳定性试验 选用按上述 2.1 方法制备出的复方长效土霉素注射液, 煮沸 40 min, 如有变色、析出、沉淀则不合格, 如颜色不变、无析出、沉淀为

合格。选用按第 2.1 方法制备出的复方长效土霉素注射液,连续在 1000 LX 光照 30 d,如有变色、析出、沉淀则不合格,如颜色不变、无析出、沉淀为合格。选用按第 2.1 方法制备出的复方长效土霉素注射液,40℃连续保温 60 d,如变色、析出、沉淀则不合格,颜色不变、无析出、沉淀为合格。

2.3 疗效对比 将随机抽取的 160 头附红细胞体感染奶牛(体重约 400 kg)分成 4 组,每组 40 头。分组情况见表 1。试验期间各组奶牛隔离饲养,不放养,不与非试验奶牛接触。注药前和注药后 6 d 均

采血涂片、染色、镜检。采血时注射器要严格消毒,实行一牛一针头。判定标准:用药 6 d 后,耳静脉采血,制作血液涂片,姬姆萨染色后在油镜下观察 20 个视野,发现附红细胞体则判为阳性;有附红细胞体的红细胞占全部细胞 10%以下,即红细胞感染率在 10%以下,判为“+”;红细胞感染率达 10%~50%,判为“++”;红细胞感染率达 50%~80%,判为“+++”;红细胞感染率达 80%以上,判为“++++”。20 个视野均未见附红细胞体则判为阴性。依实验室检查阳性判定标准与用药前结果对比判定。

表 1 疗效对比试验分组情况

组别	编号	品种及数量(头)			用药	剂量	备注
		荷斯坦奶牛	西门塔尔	杂交牛 ¹⁾			
A组	A1~A40	13	7	20	土霉素注射液(得米先),美国辉瑞公司巴西生产厂生产	0.2 mL/kg	臀部深层肌肉注射,隔天1次,共用2次。
B组	B1~B40	12	5	23	复方长效土霉素注射液	0.2 mL/kg	臀部深层肌肉注射,隔天1次,共用2次。
C组	C1~C40	16	1	23	土霉素注射液(特澳米先),中美合资荆门亚卫江峰药业有限公司	0.2 mL/kg	臀部深层肌肉注射,隔天1次,共用2次。
D组	D1~D40	17		23	不给药	0	与试验组同时进行采血检查

1): 杂交牛指荷斯坦和西门塔尔杂交牛。

3 试验结果

3.1 稳定性试验结果 复方长效土霉素注射液连续煮沸 30 min,未见颜色变化、析出、沉淀现象;连续光照 30 d 未见颜色变化、析出、沉淀现象。在 40℃连续保温 60 d 未见颜色变化、析出、沉淀。

3.2 治疗效果 见表 2。

3.2.1 A组: 在油镜下观察 20 个视野中均未见到附红细胞体的奶牛数量为 30 头,即转阴率为 75%。

3.2.2 B组: 未见不良反应,表现症状的奶牛的精神慢慢好转,大便不带血。一次用药转阴率为 27.5%,未转阴奶牛红细胞感染率明显降低,感染红细胞破坏程度明显减少,二次用药后最后转阴率为 95%。故该药对附红细胞体有极好的效果。

3.2.3 C组: 一次给药后,35%奶牛的注射部位稍肿胀,但持续时间不长,二次给药后的转阴率为 60%。前后对比红细胞感染率有所降低,平均单个红细胞感染附红细胞体数量也有所减少,但不显著。故该药治疗效果不如其他两药,但可起一定的控制作用。

3.2.4 D组: 奶牛红细胞感染率有一定的增高趋势,且红细胞破坏程度也有所加强,平均单个红细胞感染附红细胞体数有所增加。

由表 2 可见,A 组对附红细胞体有明显的效果,而笔者研发的复方长效土霉素注射液(B 组)

效果优于 A 组,C 组对附红细胞体能取到控制的效果,但完全治愈的效果不是很理想。D 组对对照组有病情加重的趋势。故不同厂家的长效土霉素注射液的效果有明显的区别。

表 2 治疗结果对照

组别	治疗前感染数	治疗后转阴数(头)		转阴率(%)	
		第一次	第二次	第一次	第二次
A组	40	30	34	75	85
B组	40	11	38	27.5	95
C组	40	22	24	55	60
D组	40	0	0	0	0

4 小结

土霉素通过用六水氯化镁螯合反应,并加入了适当的增效剂二甲氧嘧啶、抗原虫药三氮脒及退热药对乙酰氨基酚,其性能稳定。在沸水中煮沸 40 min,未发现颜色变化、析出、沉淀现象。在连续光照 60 天,未发现颜色变化、析出、沉淀现象。在 40℃连续保温 60 天,未发现颜色变化、析出、沉淀。表明复方长效土霉素注射液在在规定的二年保质期内应质量稳定。

从本试验结果可看出,复方长效土霉素注射液比进口长效土霉素注射液疗效更显著,完全可替代现在国内市场上所销售的进口长效土霉素注射液。

四种手术方法治疗犬髋关节脱位的效果比较

周庆国*, 黄毅, 张滨, 余玲娜

(佛山科学技术学院动物医学系, 广东 佛山 528231)

摘要: 为探讨犬髋关节脱位几种手术方法的实际疗效及其优缺点, 选择健康家犬制作髋关节脱位模型, 分别施行人造圆韧带植入术、髋关节囊外固定术、股骨头切除术和髋关节囊单纯缝合术, 术后对实验犬术肢的运动机能、负重耐力及髋关节结构等进行了观察。实验表明, 以上各种手术对犬的年龄或髋关节结构各有要求, 其中以股骨头切除术疗效肯定、适应范围广, 而人造圆韧带植入术的疗效最差。

关键词: 犬; 髋关节囊; 髋关节脱位; 人造圆韧带; 股骨头切除

中图分类号: S857.16

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0040-03

犬髋关节脱位是小动物临床常见的关节疾病, 多因骨盆部受到间接暴力所引起, 也常继发于髋关节发育不良。髋关节脱位后依股骨头移位方向不同, 患肢似缩短或变长, 并呈内收、外展或外旋, 站立时患肢悬提或趾尖着地, 行走多呈混合跛行。据有关资料, 本病的手术疗法有髋关节人造圆韧带植入术^[1]、髋关节囊外固定术^[2]和股骨头切除术^[3,4], 但缺乏描述各自的优缺点及如何选用。为了对本病的治疗提供有意义的参考, 本实验在选择家犬制作髋关节脱位模型的基础上, 分别采用以上三种手术方法治疗, 并以髋关节囊单纯缝合术作为对照, 对四种手术方法的疗效及其优缺点进行了对比观察。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 本地家犬 8 只, 年龄为 4 月~9 岁, 体重 3~3.5 kg。按购买顺序随机分为 4 组, 每组 2 只犬, 常规单笼饲养, 饲喂商品狗粮, 每天进行临床检查, 观察 10 d 后无任何异常开始进行实验。

1.1.2 实验药品 2% 静松灵、盐酸氯胺酮、硫酸阿托品、氨苄青霉素、新洁而灭、2% 碘酊、75% 酒精等。

1.1.3 手术器械 常规手术器械、骨科器械、医用指骨钢板、自制套索针等。

1.2 方 法

1.2.1 模型制作 手术前一天, 剪除术部周围被毛。手术前先使用静松灵 0.2 mL/kg 进行镇静, 完成保定、清洗术部、碘酊消毒、酒精脱碘等一系列操作, 然后将 2 mL 氯胺酮加入到 5% 葡萄糖溶液 100 mL 中滴注维持麻醉。手术选择髋关节背侧或前侧入路, 以髋关节前侧髂骨向大转子、再转向股

骨中央作弧形皮肤切开, 清理皮下组织, 分离显露股阔筋膜张肌、臀中肌和股二头肌; 识别臀浅肌, 在该肌抵止点前将肌腱切断, 把臀浅肌翻向背侧, 暴露出臀中肌。然后, 可分别采取截断大转子或横断臀中肌暴露髋关节囊的两种方法, 前者使用骨凿或骨锯切断大转子顶端, 包括臀中、深肌的抵止点, 使大转子骨切线与股骨长轴成 45° 角, 然后将臀中肌、臀深肌和被切断的大转子顶端一并翻向背侧暴露关节囊; 后者则直接将臀中肌、臀深肌切断, 暴露关节囊。将关节囊切开并向两侧伸延, 显露整个关节腔, 将股骨头圆韧带切断后, 即可制作出犬髋关节脱位模型。

1.2.2 手术选择 在对 4 组实验犬制作髋关节脱位模型的基础上, 分别施行人造圆韧带植入术^[1]、髋关节囊外固定术^[2]、股骨头切除术^[3,4]及关节囊单纯缝合术。实验犬分组及手术选择见表 1。

表 1 实验犬分组及手术选择

分组	犬号	性别	年龄	手术选择	手术入路
1	1	♂	7月	人造圆韧带植入术	髋关节背侧入路
	2	♂	5月	人造圆韧带植入术	髋关节背侧入路
2	1	♀	8月	髋关节囊外固定术	髋关节背侧入路
	2	♂	5月	髋关节囊外固定术	髋关节背侧入路
3	1	♀	5月	股骨头切除术	髋关节前侧入路
	2	♂	4月	股骨头切除术	髋关节前侧入路
4	1	♂	1岁	关节囊单纯缝合术	髋关节前侧入路
	2	♂	9岁	关节囊单纯缝合术	髋关节前侧入路

1.2.3 术后护理与观察 术后肌肉注射氨苄西林 0.5 g/只, 每天 2 次, 连续 5 d。实验犬单笼饲养, 继续常规饲喂幼犬颗粒狗粮, 每天 2 次, 以保证营

养。术后 7 d 内限制其活动, 之后逐步增加运动时间。术后 7~10 d 根据术部愈合情况, 酌情拆除皮肤缝线。术后每天观察实验犬的运动表现, 如术肢的站立、行走姿态, 是否出现跛行或跛行的种类、程度等, 观察期为 5 个月。手术 1 月后, 每月对比测试实验犬两后肢的负重耐力(以健肢站立超过 60 min 为测试限度), 比较两后肢负重时间的差异。术后间隔一定时间, 对髌关节进行 X 线摄片观察。手术 5 月后淘汰实验犬, 剖检观察髌关节的结构变化。

2 结果

2.1 术肢运动机能观察 在术后 5 个月观察期内, 4 组实验犬中有 6 只犬术肢功能均得到较好恢复, 站立和行走状态由术后早期所表现的中度跛行而转为轻度跛行或跛行不明显。在股骨头切除术组中, 2 号犬因股骨移位而导致术肢明显缩短, 由于不能正常负重而逐渐发生肌肉萎缩, 始终表现中度跛行。在髌关节囊外固定术组中, 1 号犬坐骨神经在手术中不慎伤及, 术后表现坐骨神经不全麻痹姿势, 至观察期结束未能恢复。

2.2 术肢负重耐力测试 先以实验犬后肢中的健肢为对照进行耐力测试, 然后对术肢进行负重耐力测试。结果发现, 4 组实验犬的术肢负重耐力不同, 以接受髌关节囊外固定术和股骨头切除术的术肢负重耐力较好, 而接受人造圆韧带植入术的术肢负重耐力最差; 接受髌关节囊单纯缝合术的实验犬活泼好动, 无法测试, 其术肢所有表现与健肢无异。实验犬负重耐力测试结果见表 2。

表 2 实验犬负重耐力测试结果

		单位: min		
手术选择	测试肢	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月
人造圆韧带植入术 (1 号犬)	健肢	>60	30	12
	术肢	40	10	5
人造圆韧带植入术 (2 号犬)	健肢	45	30	>60
	术肢	28	11	28
髌关节囊外固定术 (2 号犬)	健肢	7	28	>60
	术肢	4	13	>60
股骨头切除术 (1 号犬)	健肢	30	45	>60
	术肢	15	37	>60
关节囊单纯缝合术 (1 号、2 号犬)	健肢	因实验犬活泼好动, 无法测试。		
	术肢	因实验犬活泼好动, 无法测试。		

2.3 术肢 X 线摄片检查 术后 3 个月的 X 线影像显示: 人造圆韧带植入术组 2 号犬的人造圆韧带套索针位于骨盆腔原位, 股骨头与髌臼结合紧

密, 但关节腔与对侧正常髌关节相比, 关节间隙几乎消失(图 1)。髌关节囊外固定术组 2 号犬健肢髌关节正常, 术肢股骨头已离开髌臼, 停留于近髌臼缘处(图 2)。股骨头切除术组 1 号犬术肢股骨头被切除, 髌臼变浅, 股骨头切除处与髌臼对合准确, 假关节形成良好(图 3)。



图 1 人造圆韧带植入术组(2 号犬 X 线片)



图 2 髌关节囊外固定术组(2 号犬 X 线片)



图 3 股骨头切除术组(1 号犬 X 线片)

2.4 术肢髌关节剖检 术后 5 个月剖检术肢髌关节发现, 人造圆韧带植入术组 1 号犬髌关节囊破坏很大, 人造圆韧带发生断裂, 股骨头脱离髌臼, 固定于髌臼边缘, 之间有少量软组织, 同时髌臼变浅, 内

有大量纤维组织增生 (图 4); 2 号犬髌关节囊良好, 关节液透明, 关节腔内无组织碎片, 但人造圆韧带同样发生断裂, 股骨头表面光滑, 中央孔道口有软骨缺损和凹陷, 髌臼窝内有少量纤维组织增生 (图 5)。髌关节囊外固定术组 1 号犬髌关节囊愈合很好, 骨盆髌臼缘安置的两个骨螺钉以及缝线等被纤维组织所包裹, 切开关节囊有澄清滑液流出 (图 6); 2 号犬髌臼缘的两个骨螺钉被软组织包

裹, 固定缝线发生断裂, 股骨头脱离髌臼, 与髌臼边缘形成假关节, 髌臼变浅, 内有纤维组织增生。股骨头切除术组 1 号犬髌臼和股骨头断端之间形成一个由纤维组织及附近肌肉组织所构成的坚强的假性关节, 髌臼内增生的组织使髌臼变浅, 股骨与髌臼紧密连接在一起 (图 7)。髌关节囊单纯缝合术 2 只犬髌关节囊愈合良好, 囊内关节液澄清, 股骨头与髌臼结构正常, 未见任何破坏 (图 8)。



图 4 人造圆韧带植入术组 1 号犬髌关节剖检结果

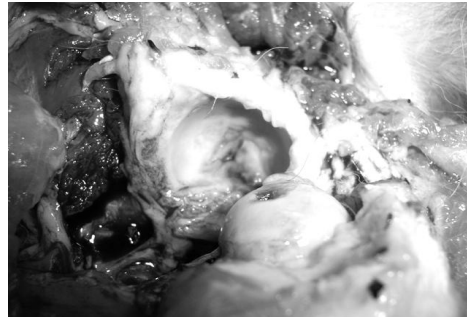


图 5 人造圆韧带植入术组 2 号犬髌关节剖检结果

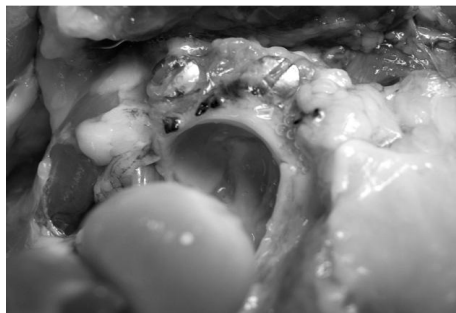


图 6 髌关节囊外固定术组 1 号犬髌关节剖检结果



图 7 股骨头切除术组 2 号犬髌关节剖检结果



图 8 髌关节囊单纯缝合术组剖检结果

3 讨论

3.1 人工圆韧带植入术的治疗效果评价 对实验犬剖检发现, 其髌臼内均有不同程度的组织增生, 股骨头表面软骨缺损, 关节面变薄; 其中 2 号

犬股骨头虽未脱出髌臼, 也可见软骨明显损伤。分析软骨损伤的原因: 一是人造圆韧带断裂前, 丝线与股骨头及髌臼窝的不断摩擦; 二是一旦缝线 (人造圆韧带) 断裂和股骨头脱出, 术肢活动范围变大, 股骨头与髌臼不当摩擦会加重软骨损伤; 三是术后关节滑液经髌臼孔道流失, 关节活动缺乏润滑, 摩擦力增大引起软骨损伤。实验表明, 人工圆韧带植入术可造成髌关节软骨明显损伤, 容易引起关节出现长期的慢性疼痛, 从而导致实验犬术肢负重耐力显著降低。同时由于健肢长期负重过度, 容易发生疲劳性损伤和负重耐力降低, 1 号犬即是如此。

3.2 髌关节囊外固定术的治疗效果评价 根据本组 1 号犬剖检结果, 关节囊外固定线依然完好,

(下转第 51 页)

犬肾结石合并膀胱结石一例及其分析

陈 瑞, 王 飞, 张 洋, 杨清华, 熊惠军
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0043-02

尿石症是指尿路中盐类结晶凝结成大小不一、数量不等的凝结物,刺激尿路黏膜而引起的出血性炎症和尿路阻塞性疾病^[1]。可分为肾结石、输尿管结石、膀胱结石和尿道结石^[2]。尿石症是犬的常见多发病,临床上表现为排尿姿势异常、尿痛、尿淋漓或尿闭。尿石症若得不到及时诊治,长期下去可引起肾脏功能衰竭,危及动物生命。笔者在临床中遇到一例犬肾结石合并膀胱结石病例,并由此对本病的病因、诊断、治疗及预防进行分析讨论。

1 病例介绍

2008年4月10日,笔者接诊了一头史纳沙犬,雌性,5岁。主诉:三天前,该犬拒食,能少量饮水,常有排尿动作而只排出少量尿液,呈淋漓状,带有血色;该犬平时爱吃鸡肝和其他肉食。常规检查结果:体温39.5℃,心律不齐,鼻镜干燥,眼结膜及口腔黏膜苍白,下腹部触诊敏感,用力按压后有疼痛感。X线摄片结果:右侧肾脏和膀胱有高密度物质存在(见图1、图2)。根据临床症状和X线检查结果,诊断该犬为右肾结石合并膀胱结石。

由于该犬已出现少尿症状,且身体状况较差,治疗效果可能不太理想,主人放弃治疗。

2 分析讨论

2.1 病因 尿石症的病因比较复杂,总体说来与

以下几方面因素较为相关,如全身代谢因素、尿路因素、营养及品种因素^[3]。

2.1.1 代谢因素 结石的形成与机体新陈代谢关系密切,机体代谢产物是形成结石的主要成分。犬尿结石大致可以分为磷酸铵镁盐结石、草酸盐结石、尿酸盐结石、胱氨酸结石^[4]。磷酸铵镁盐结石俗称“鸟粪石”,主要是由磷酸铵镁盐或酸在尿中的过饱和所致^[5]。尿酸盐结石,形成机制大致为异质成核起启动草酸钙结石形成、尿中抑制活性降低和取向附生起启动草酸钙结石形成。胱氨酸结石,由尿中胱氨酸过饱和所致。草酸铵结石,是由摄入过多草酸前体、维生素C及缺乏维生素B6所致。

2.1.2 尿路因素 尿路因素主要包括尿滞留、尿路感染、尿路异物等。

2.1.3 营养因素 长期饲喂以动物肝脏、肉等高蛋白物质,以及饮水不足时,可导致尿中盐类浓度过高,促进尿石形成^[6]。犬的日粮中维生素A不足或缺乏可引起肾和尿路上皮形成不全或脱落,从而引起尿结石的核心物质增多而形成结石。本病例中犬常食用鸡肝,可能是引起其肾结石的一个主要原因。

2.1.4 品种因素 发病率较高的有:京巴、西施、腊肠、大麦丁、苏格兰小猎犬^[5,7],混血品种的犬也常受尿结石的困扰。发病率低的有:贵宾、德国牧

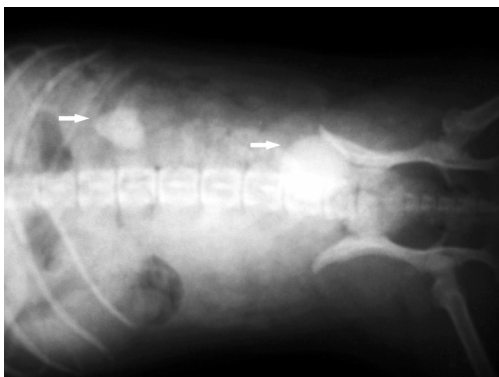


图1 患犬背腹位平片

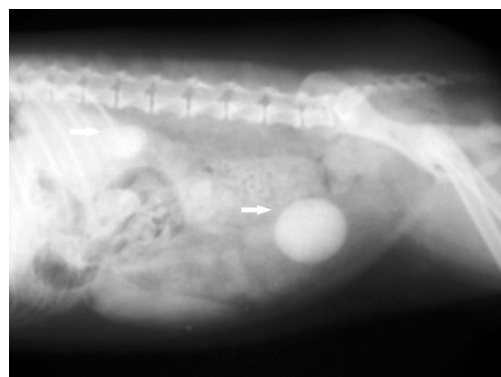


图2 患犬右侧位平片

羊犬和拳狮犬。一般雄性犬患尿结石的几率是雌性犬的 2 倍。

2.2 诊断

2.2.1 临床检查 精神沉郁, 腹部触摸疼痛, 食欲不振或废绝, 常做排尿姿势, 出现血尿。由此可做出初步判断为肾结石。触诊膀胱敏感, 有时还可触诊到膀胱内结石, 频频出现排尿姿势, 但尿很少或无尿。由此症状可初步判断为膀胱结石。

2.2.2 X 线检查 X 线检查是临床中常用的诊断方法。在普通 X 线腹平片上能显示的结石显影的为阳性结石, 否则为阴性结石。

一般拍摄正侧位平片。阳性结石大于 5 mm 时, 在 X 线腹部平片上容易显示出来; 小于 5 mm 时, 诊断较困难, 容易造成漏诊^[8]。对于怀疑有阴性结石的病犬可采取静脉尿路造影技术。在造影过程中静脉滴注速尿, 不仅能缩短造影时间, 而且可提高诊断效率^[9]。

2.2.3 B 超检查 随着影像技术的发展, 超声影像在临床上广泛应用, 弥补了 X 线诊断尿结石疾病的不足, 大大提高了肾小结石的诊断价值。

肾结石的声像主要表现: ①强回声光团和其后方伴随声影。②肾盏内或肾盂内小结石, 强回声呈椭圆形, 伴随后方声影, 在结石周围有少量尿液。③肾结石合并肾积水时, 出现扩张的肾盂肾盏图形^[10]。

B 超检查可判定结石的大小、数目、所处的部位及立体空间位置。目前能发现直径 3 mm 的小结石, 使一些 X 线检查不能发现的小结石得到证实, 临床实用价值大为提高。

2.3 预防 科学饲喂, 日常营养应以均衡的狗粮为主。饲喂以米饭和动物性蛋白为主的酸性食物及低钙性食物, 可防止磷酸铵镁结石的形成。在日粮中适当添加碳酸氢钠, 可抑制膀胱与尿道结石的形成。口服异嘌呤醇 4 mg/kg, 每天 1 次, 可防止形成尿结石。同时要足量饮水, 有泌尿系统炎症时及时治疗。

随着宠物行业的发展, 宠物食品中出现了处方粮。因此, 也可投给处方粮以防治尿结石。如希尔斯公司的泌尿系统处方粮 c/d、w/d、s/d、u/d。

2.4 治疗

2.4.1 药物疗法 根据诊断的结果, 如果结石大小在 3 mm-5 mm 之间, 可采用人用的排石饮品, 连用 7~10 d^[11]; 也可应用利尿酸、醋酸钾、氨茶碱

等利尿药物促使尿液排出; 还可通过拌食饲喂氯化铵、酸性磷酸钠, 以酸化尿液, 使结石溶解^[12]。

2.4.2 体外冲击波碎石术 1978 年, 将人类肾结石移植在犬肾内进行体外冲击波碎石取得成功^[13]。该技术已在临床上应用。迄今为止, 该设备是世界上比较昂贵的医疗设备之一, 限制了其在小动物临床上的应用。

2.4.3 经皮肾镜取石术 20 世纪 80 年代, 经皮肾镜取石术开始广泛应用于肾结石的治疗。随着我国宠物行业的发展, 该技术有望应用于小动物临床的治疗中。

2.4.4 开放性手术疗法 目前, 肾结石的外科治疗仍然以开放式手术为主。在一侧肾功能完好的情况下, 可考虑切除另一侧患肾。如果两侧肾功能都不太理想, 可考虑肾盂切开取石术、肾实质切开取石术、肾部分切除术^[14]。也可考虑肾脏移植手术, 文献已经有过报道^[15]。对于膀胱结石, 则常采用膀胱切开术以取出结石。

犬肾结石最好是早发现早治疗, 否则小结石下行致膀胱, 引起膀胱结石。如果发现有泌尿系统疾病, 应该对犬做全面检查, 必要时可做血常规、血液生化检查, 以便能够及时诊断出该病, 进行治疗, 控制和消除结石。饲喂犬时不要给予过多的动物肝脏、瘦肉等高蛋白质食物, 必要时可购买犬专用商品日粮喂犬。

参考文献:

- [1] 王俊东, 刘宗平. 兽医临床诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 162-163.
- [2] 姜晓文, 于文会, 金炯龙, 等. 犬尿路结石的综合治疗[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (1): 74-75.
- [3] 白志忠, 马德明, 汪英. 犬肾结石[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1995, (8): 39-40.
- [4] Ling GV, Franti CE. Urolithiasis in dogs[J]. Am J Vet Res, 1998, 59(5): 24-27.
- [5] 周秋平, 金银姬, 石益兵, 等. 56 例犬尿结石的检验及成因分析[J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(4): 35-37.
- [6] 王建华. 家畜内科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 149-153.
- [7] Houston DM, Moore AEP, Favrin MG. Canine urolithiasis: a look at over 16000 urolith submissions to the Canadian Veterinary Urolith Centre from February 1998 to April 2003[J]. Canadian Veterinary Journal, 2004, 45(3): 225-230.

(下转第 49 页)

犬皮肤病的诊断与防治措施

李成梅, 古飞霞, 许丹宁, 刘容珍
(仲恺农业工程学院生命科学院, 广东 广州 510225)

中图分类号: S857.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0045-03

犬的皮肤病是临床发病率较高、病理过程长、类症鉴别难度大的疾病,其致病因素较为复杂,且种类繁多,仅凭经验或肉眼观察难以做出正确诊断。目前,虽然很多动物医院拥有先进的检验设备,但因操作技术水平不高,对多种病原认识不足,常常出现假阳性或假阴性结果,故导致临床治疗效果不佳,甚至拖延病情造成医源性并发症。犬的皮肤病有品种、年龄及个体差异,受饮食结构、生活环境、应激因素的影响很大。如果用药途径、药物剂型、用药时间不当或继发感染会给治疗带来更大的难度。现就常见皮肤病的诊治情况介绍如下。

1 分类

根据引起犬皮肤病的常见病原(或病因)可将其分为十类:(1)真菌性皮肤病:如由毛疮白癣菌、白色念珠菌、大小芽胞皮癣菌、厚皮马拉色氏霉菌^[1]引起的皮损,其中以小孢菌和毛癣菌最多;(2)寄生虫性皮肤病:如由螨虫引起,包括人畜共患犬疥螨,犬耳痒螨,犬蠕形螨等^[2];钩虫幼虫移行,跳蚤;(3)细菌性皮肤病:主要由金色葡萄菌引起的脓皮病;(4)病毒性皮肤病:如犬瘟热病毒引起的皮损;(5)代谢性皮肤病:如糖尿病;(6)脂溢性皮肤病;(7)自身免疫性皮肤病;(8)身体损伤引起的皮肤组织破坏;(9)与遗传有关的皮肤病如腊肠犬等品种易发^[3];(10)维生素及微量元素缺乏引起的皮肤病等。据有关人员的调查显示,在以上病因中以寄生虫,尤其是螨虫的感染率最高,真菌性皮肤病的危害最严重^[4]。

2 临床症状

患犬主要表现为患部皮肤发红,骚痒,不时抓咬,被毛脱落,局部皮肤发炎,局部形成溃疡或结

痂,皮肤增厚,有的如橡皮样。有的病初发于四肢,耳根,腹部,出现红斑和丘疹,由于搔痒抓破皮肤而出血,结痂,脱毛等。患病部位主要集中在皮肤皱褶部位,可能与该部不易清洗,局部形成厌氧环境有关。

3 诊断

3.1 病原体检查 用钝器从患病部位刮取黄豆大小的痂皮(应刮较深部位,直至皮肤出现少量血液),毛根或耳道分泌物置于载玻片上,滴加透明液或乳酚棉蓝液,加盖玻片于显微镜下暗视野直接镜检。对于痂皮较多的病料可加10% KOH溶解,但往往会影响真菌形态的观察。对疑似螨虫感染的病犬可用透明胶纸粘取少量的皮屑或脓性分泌物加透明液进行镜检。该方法具有采样方便,用量少,病犬痛苦少,虫体在镜下易于分辨等优点。

3.2 临床诊断

3.2.1 真菌性皮肤病 表现剧痒,大面积严重脱毛,体表遍布红色丘疹、斑疹,脱毛区覆盖油性厚痂。刮去痂皮裸露潮红或溃烂的表皮,严重者形成溃疡,患部在后期出现色素沉着,毛根易脱,毛易断,取毛根镜检可见小孢霉菌体。毛癣菌感染常在患部出现局限性脱毛,形成“铜元癣”。

3.2.2 寄生虫性皮肤病 疥螨虫引起的皮肤病传染性极强,虫体主要寄生于耳尖外侧、耳根、脚趾和口周围等皮肤较薄的部位。病变部位脱毛、结痂、皮肤发红、增厚。痒螨主要寄生于耳道内,经接触传染,临床上可见耳道发炎充血,内有多量褐色或灰白色分泌物,并有腥味,是引起中耳炎的主要病原之一。镜检可见大量虫体和虫卵。蠕形螨病寄生于毛囊、皮脂腺,免疫功能下降常引起全身性蠕形螨

病。病初犬颜面两侧皮肤潮红,充血,继而发生脱毛,并向颈部,胸腹下推移。患部散布豆粒大小的丘疹、水泡、脓疱疹,伴有脱毛和皮脂溢出。取病变部位检查可见虫体。本病自然感染率高,但发病率低。随着对药物耐药性的增加,发病率逐年升高。

3.2.3 钩虫移行引起的皮肤病 患犬往往极度消瘦,可取粪便进行漂浮镜检虫卵。

3.2.4 细菌感染性皮肤病 对怀疑为细菌感染而引起的皮肤病,在尝试性治疗的同时,要作微生物培养和药敏试验,以便确诊和选用适宜的药物。在微生物培养结果出来之前,应选用广谱抗生素,低剂量使用。

3.2.5 病毒性皮肤病 病毒性皮肤病多数有病毒感染史,体温升高,食欲减退或废绝,体表散布块状紫红色斑疹,有痒感,有时可出现水泡、脓疱,最后形成结痂,痂下有一硬结。

3.2.6 维生素缺乏性皮肤病 维生素缺乏性皮肤病具有群发性,非传染性,饲喂日粮单一等特点。改变日粮或额外添加维生素,往往症状好转。患犬被毛无光,毛易断、易脱。皮肤表面有豆粒大或拇指大小的出血斑,皮屑增多,痒感不明显。

3.2.7 全身免疫性皮肤病 全身免疫性皮肤病主要依靠病史,临床症状,活组织检查,抗体效价测定,对系统性红斑狼疮主要依靠DNA的检测和抗核抗体的检出进行确诊。

3.2.8 代谢性皮肤病 对代谢性皮肤病如糖尿病,应检查血中的胰岛素含量,甲状腺机能减退要测定血中甲状腺激素的水平,以便确诊和分型。

4 鉴别诊断

4.1 犬寄生虫性皮肤病的临床发病率约占皮肤病的60%以上,主要有蠕形螨病、疥螨病、耳螨病、虱病、蚤病、蜱感染等。因其病原不同,致病作用有很大差别。诊断螨病要通过镜检发现虫体。蠕形螨病具有遗传性,多发于德国牧羊犬、腊肠犬、北京犬,杜博文犬、斗牛犬,感染此病具有顽固性,同窝犬的发病率达80%~90%。患病犬用于繁殖或在其发情、配种后体内激素分泌水平改变而导致本病复发,或继代、隔代遗传给不同的个体。机体免疫功能降低时可诱发本病。蠕形螨病以无明显痒感的皮肤渗出、结痂、形成皱褶为特征,病变主要发生在头部、眼睑周围及四肢末端。疥螨

病为人犬共患病,以剧烈瘙痒、湿疹性皮炎为特征。主要发生在面部头顶、耳廓及腹侧,多发于猎犬、小型狮子犬。耳痒螨病以耳部瘙痒、耳廓内棕褐色分泌物为特征。虱病、蚤病、蜱感染常因虫体叮咬和机械性刺激造成皮肤损伤。史宾格犬虱感染的发生率相当高,严重者虫体产卵及其排泄物覆盖在被毛上。蚤的唾液可以成为变应原,使寄生部位的皮肤发生直接迟发型过敏反应,不同种的蜱其致病性有较大差异,是很多血液寄生虫病的传播媒介。

4.2 真菌性皮肤病中皮肤丝状菌病感染率最高,其病原体70%是犬小孢子菌,20%是石膏样小孢子菌,10%是须发毛癣菌。此种皮肤病变以鳞屑、痂皮、皮肤形成圆形脱毛或被毛断裂病灶为特征。采集病变边缘的被毛或皮屑,经处理于弱火焰上微加热后低倍镜观察或用伍德氏灯照射病变部被毛,以见到菌丝或分节孢子群来确诊。诺卡氏菌病以颈部、四肢皮下出现波动性脓肿为特征,孢子丝菌病以皮肤形成肉芽和溃疡为特征,芽生菌病、毛霉菌病以皮下组织肉芽肿和脓肿为特征。诊断依据均以直接镜检和真菌培养出孢子或菌丝为准。

4.3 变态反应性皮肤病主要是指与食物、药品、化学物质、环境因素等刺激源有关而引起犬的迟发型或速发型变态反应。常见的有过敏性皮炎、荨麻疹、湿疹、柯利鼻等。过敏性皮炎以皮肤瘙痒、丘疹、红斑为特征,与品种、个体、免疫水平关系较大。荨麻疹以皮肤真皮上层局限性扁平丘疹快速消退为特征,属于速发型变态反应。湿疹属于皮肤的轻型过敏性炎症,急性湿疹以点状或多形性界限不明显的皮疹伴有瘙痒和湿润为特征;慢性湿疹以皮肤增厚和苔藓样变化及形成皱褶,并伴有色素沉着为特征。柯利鼻为皮肤对日光的紫外线过敏所致,多发生于柯利犬、雪特兰牧羊犬、丝毛犬、日本犬,以鼻梁和鼻端脱毛、红肿、渗出、糜烂、溃疡为特征。这一类型的皮肤病只要切断刺激源,使用抗过敏药物,同时投予低过敏处方食品即可恢复。

4.4 脂溢性皮肤病以脂质代谢异常所表现的皮肤角化不全,皮脂腺分泌异常亢进,被毛间附有多量灰白色麸皮样鳞屑或黄褐色油脂性皮屑为

特征。杜博文犬、牧羊犬、鹿犬等多为干性型病变,呈疏毛状态;油性型病变多发生于沙皮犬、可卡犬、斑点犬、斗牛犬、猎犬等,皮脂腺发达的尾根部粘附黄褐色油脂块。临床诊断依据粪便脂肪消化率、食物中脂肪酸含量及甲状腺功能测定结果做出。

4.5 激素性皮肤病主要有雌激素过剩症、睾丸支持细胞瘤、皮质醇增多症、黑色素表皮增厚症。睾丸支持细胞瘤以左右对称性脱毛发展到仅剩脊背一条被毛为特征,多发于老龄犬。皮质醇增多症以母犬发情周期停止,雄性性欲减退,砂纸样皮肤皱裂,无瘙痒的对称性脱毛,只残留头部和四肢末端的被毛为特征。雌激素过剩症多发于5岁以上的母犬,以异常子宫出血和发情样症候伴随腹部皮肤左右对称性脱毛为特征。黑色素表皮增厚症以病变呈两侧对称性、表皮增厚、角化和黑色素沉着为特征,多发于腊肠犬、长毛狮子犬等犬种。激素性皮肤病一般不瘙痒、对称性脱毛,皮肤色素化,它是全身症状的局部表现。

4.6 细菌性皮肤病的典型代表是由化脓性细菌感染引起的脓皮症、趾间脓皮症。脓皮症发病部位不确定,以丘疹、脓疱疹、毛囊炎、皮肤皲裂及无瘙痒为特征;趾间脓皮症见于犬单肢或四肢的趾间发生脓疱,形成瘰道。本病多发于德国牧羊犬、罗威纳犬、大丹犬。

5 治疗

皮肤病总的治疗原则是减少皮肤损伤,增加机体的抵抗力。但病因复杂,要做到因病施治。

5.1 螨虫感染的治疗一般采用皮下注射伊维菌素,用量为0.02~0.20 mL/kg体重,每7天一次,一般3~5次即可治愈。临床实践发现,Ivomec(0.1 mL/kg体重,3~5天一次,连用3~4次)是一种有效杀灭体内和皮肤深层病原的药物,配合溶痂的中药,抗生素防止继发感染,维生素增强机体抵抗力,具有很好的治疗效果。同时应配合犬舍环境的消毒,全身感染者可采用药浴。线虫感染可选用丙硫咪唑、吡喹酮等药物内服,同时作好犬舍的消毒工作。

其它方法:可用螨净2.5 mL、硫磺末3 g、洋芋去皮250 g(捣成糊状)、苦参末30 g,诸药拌匀加

水1 000 mL,涂患处,每日1次。中药苦参3~7 g,白鲜皮3~7 g,首乌3~7 g,煎汁服,每天1剂,连用1周。

5.2 真菌感染性皮肤病的治疗应剪掉患部被毛,隔离治疗。灰黄霉素25~50 mg,内服,连用5周,或用酮康唑0.1 g/kg,分三次内服,连用8周;外用制霉菌素、克霉唑、二性霉素等抗真菌药物。深部真菌感染用二性霉素,按0.4 mg/kg体重用量加入5%的葡萄糖中,静滴,隔2日一次,总用量不超过4 mg/kg;也可使用中药苦参30 g、百部30 g加70%酒精300 mL,封口浸泡一周后使用。中药土桂皮酊对止痒有很好疗效,实验证明单味中药丁香、羊蹄或桅子都对真菌具有较强的抑制作用。硫黄和尿素软膏具有良好的溶解皮屑的作用,同时也有抑制真菌生长的功效。

5.3 病毒感染性皮肤病的治疗对因病毒感染引起的皮肤病,应积极治疗原发病,增强机体抵抗力,缓解临床症状。这类病最好不要使用皮质激素类药物。因其易导致免疫抑制,降低机体的抵制力。

5.4 维生素缺乏性皮肤病的治疗对维生素缺乏引起的皮肤病应逐渐改变日粮,饲喂富含维生素的日粮。

5.5 自身免疫性皮肤病的治疗自身免疫性皮肤病可以采用四环素和烟酰胺进行治疗^[5]。根据实验结果显示用两种药物对患盘状红斑狼疮的犬进行治疗,40%的犬反应极好,30%有效。同时可以使用皮质激素类药物和硫唑嘌呤等免疫抑制剂。

5.6 脂溢性皮肤病的治疗应减少日粮中脂肪的摄入,同时配合使用维生素A、B₁。

参考文献:

- [1] 吴德峰. 某些中草药对犬猫皮肤病病原菌抑制效能试验[J]. 中兽医学杂志, 1996, (4): 31-32.
- [2] 刘维忠. 郑州犬皮肤3种螨爪形态观察及治疗[J]. 河南畜牧兽医, 1995, 2(16): 16-19.
- [3] 林德贵, 郭忠, 刘秀芬. 犬皮肤病的临床分类及诊治[J]. 中国兽医杂志, 1998, 9(21): 51-52.
- [4] 王祥生, 于洪俊, 张晓滨 等. 犬和狐皮肤病流行情况及防治[J]. 中国兽医科技, 1999, 2(29): 16-17.
- [5] Stephen D W, et al. 用四环素和烟酰胺治疗犬自身免疫性皮肤病[J]. 国外兽医学- 畜禽疾病, 1995, 2(15): 28-31.

关于完善能繁母猪保险政策的思考

颜卓友

(阳江市畜牧兽医局, 广东 阳江 529500)

摘要: 能繁母猪保险是国家出台的一项政策性保险, 对稳定生猪生产具有积极作用, 但目前还存在一些不科学不完善的地方, 制约了能繁母猪保险事业的健康发展及其功能的全面发挥。本文通过回顾一年来能繁母猪保险工作情况, 分析存在问题, 提出了进一步完善能繁母猪政策的对策和建议。

关键词: 能繁母猪; 政策性保险; 建议

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0048-02

为有效降低养殖能繁母猪的风险, 鼓励能繁母猪生产, 2007年《国务院关于促进生猪生产发展稳定市场供应的意见》提出, 国家建立能繁母猪保险制度, 保费政府负担80%, 养殖户(场)负担20%。要求在总结能繁母猪保险工作的基础上, 逐步开展生猪保险, 建立保险与补贴相结合的制度, 拉开了能繁母猪保险的序幕。广东省财政厅、保监局、农业厅等部门出台了《广东省政策性能繁母猪保险实施方案》、《广东省能繁母猪保险保费补贴资金管理暂行办法》和《广东省能繁母猪养殖保险条款》等具体政策, 全省各地从2007年陆续开展能繁母猪保险工作。阳江市2008年共承保能繁母猪264 357头, 实现了能繁母猪100%投保的目标。但能繁母猪保险工作中也发现一些不足, 遇到一些问题, 有待进一步解决和完善。

1 开展能繁母猪保险的主要做法

1.1 政府重视, 落实保费补贴资金。 能繁母猪保险是政策性保险, 每头母猪60元保险保费, 其中养殖户负担20%, 省、市、县三级财政分担80%。因此, 必须有各级政府的重视, 落实保费补贴资金才能顺利开展。为做好能繁母猪保险工作, 阳江市政府成立了由分管农业的副市长任召集人, 财政、农业、畜牧、宣传、保险承办机构等部门负责人参与的能繁母猪保险联席会议, 联席会议下设办公室, 设在市委农办。发出了《关于推进能繁母猪保险工作的通知》, 要求各地要提高认识, 加强领导, 落实保费财政补贴资金, 实行直接承保与统保和保险与补贴相结合的制度。

1.2 畜牧部门全力参与。 开展能繁母猪保险首先要做的工作, 就是逐户上门向养殖户做宣传发动

工作, 并登记饲养头数, 收取保险费。我市能繁母猪饲养分散、面广、量大, 26万多头母猪分布在7000多平方公里的土地上。这需要花大量的人力, 也需要一定的财力和物力。单靠保险公司的力量是不可能做到的, 必须有畜牧部门的参与。

1.3 实行保险与补贴相结合的制度。 2008年国家继续对能繁母猪饲养给予补贴, 补贴标准是每头100元。把保险与补贴结合起来, 养殖户实际上不需要承担保险费。参加保险既能得到风险保障, 还能得到每头88元的补贴。这为保险工作的开展提供了十分有利的条件。

1.4 加强防疫工作, 降低母猪死亡率。 坚持把按规定免疫、落实防疫措施作为参保的先决条件。对不按规定实施强制免疫的养殖户, 不接受其投保, 从而增强养殖户的防疫意识, 促进防疫工作的落实。

2 能繁母猪保险存在的主要问题

2.1 能繁母猪补贴与能繁保险结合得不够好, 增加了行政成本。2008年6~9月, 在开展能繁母猪保险时, 花了大量的人力财力和物力进行了一次全面的能繁饲养造册登记, 逐场逐户收取由养殖户负担的保险费每头12元。现在, 实施能繁母猪补贴政策, 每头母猪补贴100元, 以11月15日为登记基准日, 又要花费大量的人力、财力和物力进行一次全面的造册登记, 登记后还要逐场逐户把补贴资金发放到养殖者手中。如果由政府为母猪饲养户统一投保, 补贴资金减少为88元, 就可以减少一次登记和收取保险费的工作。

2.2 无害化处理设施和制度建设滞后, 不利于防止疫病传播和防范道德风险。当前由于尚未建立起规范的无害化处理机构和设施, 无法对死亡生

猪集中进行无害化处理,死亡的母猪都是由保险公司理赔人员或基层兽医人员监督养殖户采用掩埋法处理,难以达到无害化的标准,难以杜绝死亡母猪被偷偷出售的现象,既不利于防范道德风险,也容易传播扩散疫病。由于死亡母猪无害化处理不规范,个别地方投保能繁母猪死亡率大大高于年死亡率3%的正常水平。按照每头保费60元,死亡赔偿标准每头1000元计,加上承保费用(每头12元)、理赔费用(每头50元)、无害化处理费用(每头200元)等,能繁母猪保险盈亏平衡的死亡率是3.84%。如果不能有效控制能繁母猪死亡,防范道德风险,能繁母猪保险将难以坚持。

2.3 理赔不及时,不利于保障投保户的合法利益。由于能繁母猪保险面广量大,全市26万多头母猪,按年死亡率3%计算,每天将死亡21头,而且分布较分散,而保险公司目前配备给能繁母猪保险的人力明显不足,难以做到及时勘查、定损、理赔。

3 完善能繁母猪保险政策的建议

3.1 进一步明确能繁母猪保险的功能定位。能繁母猪饲养的风险包括自然灾害和疫病风险两个方面,但更主要的是疫病风险。《广东省能繁母猪保险条款》规定的保险责任范围也包括自然灾害和疫病。有效预防和控制疫病也是防灾减灾、降低赔率的关键措施。因此,能繁母猪要发挥风险保障和促进防疫两方面的功能作用。事实上,能繁母猪保险也为促进防疫提供了有利条件,这就是有利收集死亡母猪集中进行无害化处理,减少丢弃甚至出售死亡母猪造成的疫病传播。同时,实行集中无害化处理也有利于防范道德风险。只要建立和健全无害化处理设施和制度,就能实现风险保障和促进防疫两方面的功能作用,同时促进能繁母猪保险事业的健康发展,也有利于保障食品安全。

3.2 加强无害化处理设施和制度建设,有效防止疫病传播和防范道德风险。要按照《病害动物和

病害动物产品生物安全处理规程》,建立死亡母猪无害化处理场,由市保险公司和畜牧兽医部门各派出人员进行监督管理,保险公司重点监督无害化处理的头数,畜牧兽医部门重点监督是否按规定进行无害化处理。无害化处理费用通过两个渠道解决,一是保险公司按照无害化处理的头数支付无害化处理费用;二是参照商务部和财政部发布的《生猪定点屠宰厂(场)病害猪无害化处理管理办法》,以每头猪80元的病害猪无害化处理费用财政补贴标准,由国家财政解决。通过对死亡母猪集中进行无害化处理,防止生猪疫病传播,确保生猪生产健康稳步发展,有效防范能繁母猪保险的道德风险和防止病害母猪非法流入市场。

3.3 实行区域性统保。能繁母猪保险,由于饲养分散,面广量大,而且缺乏可靠、明显的标识,如果不在一个较大的区域内(比如一个市或者省)全部投保,就很难防范道德风险。道德风险防范不好,就会增加赔付支出,不利于能繁母猪保险事业的健康发展。国家实行能繁母猪保险与补贴的制度,养殖户为母猪投保虽然名誉上要支付每头12元的保险费,但投保后还能获得数倍于保费的补贴,为实行区域统保提供了有利条件。既然是区域统保,是否可以简化手续,不再进行逐户造册登记,而是根据历年存栏头数和母猪发展趋势由县级保险公司与畜牧、财政部门协商,核定投保基数,养殖户负担的保费由县财政从能繁母猪补贴资金中扣出直接支付给保险公司。这样可以省略核实登记保险头数、逐户收取保费的大量工作,降低行政成本。

3.4 充分发挥兽医部门的作用,提高理赔效率。畜牧兽医部门从市到县、镇、村都有健全的网络和队伍,在能繁母猪保险工作中具有不可或缺的作用。保险公司应切实解决兽医部门配合开展能繁母猪保险工作所需的经费,调动兽医部门的积极性,提高理赔效率,取信养殖户。

(上接第44页)

- [8] 蔡玲. 肾脏小结石的超声诊断及临床表现[J]. 中国超声诊断杂志, 2006, 10(7): 782-783.
- [9] 衣春, 马雪东, 何剑飞. 速尿在静脉尿路造影中的应用[J]. 黑龙江医学, 2002, 26(1): 79-80.
- [10] 丁怡敏, 谭静华, 张梅. 肾结石的超声与线检查对比分析[J]. 中国社区医师, 2005, 7(7): 71-72.
- [11] 黄仁柏, 周明荣, 张信军. 犬尿石症的诊疗体会[J]. 畜牧与兽医, 2001, 33(1): 29-30.

- [12] 蒋加进, 陶庆树. 犬尿石症的病因分析与临床诊治[J]. 金陵科技学院学报, 2005, 21(6): 84-86.
- [13] 谷现恩, 刘继红. 尿石症[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 148-162.
- [14] 王黎敏, 卜芸, 赵斌. 肾结石的治疗进展[J]. 中国现代医生, 2007, 45(17): 147-149.
- [15] 应华忠, 潘永明, 邹煌. 同种异体 Beagle 犬肾移植模型的建立[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(3): 146-149.

非洲狮附红细胞体病的诊治

彭仕明¹, 吴智斌², 陈绚姣¹, 陈武¹

(1. 广州动物园, 广东 广州 510070; 2. 阳江市动物防疫监督所, 广东 阳江 529500)

中图分类号: S858.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0050-02

2007年4月, 我园的1头非洲狮出现高热稽留、精神沉郁、厌食和贫血等症状, 经调查诊断为附红细胞体病。经应用强力霉素取得较好的治疗效果。现报道如下:

1 发病情况及临床症状

患兽呼名“小鬼”, 16岁, 雄性。2007年4月19日在“狮山”展览馆外仿生态的运动场展出后, 表现精神沉郁, 不愿活动; 食欲、饮欲废绝, 未见粪便; 鼻镜干燥, 可视粘膜苍白, 呼吸平稳。次日见黄色水样呕吐物, 全身乏力。按急性胃肠炎治疗, 应用丁胺卡那和盐酸甲氧氯普胺进行肌注治疗, 未见好转。21日对患兽实施全身麻醉后进行采血和检查, 经实验室确诊为附红细胞体感染, 应用强力霉素治疗后, 体温下降, 食欲恢复, 精神活动正常, 病期共计11d。

2 实验室检查

2.1 血常规检查 静脉抽取血液作抗凝处理后, 进行血常规检查, 发现红细胞($59.7 \times 10^9/L$)和血红蛋白($10^3 g/L$)降低, 白细胞($2.75 \times 10^{12}/L$)升高。

2.2 鲜血压片镜检 于发热期无菌取耳端血滴抗凝, 加等量生理盐水搅匀, 置油镜下观察。可见红细胞减少, 部分红细胞受感染, 并发生形态学变化; 红细胞体积变大或皱缩, 其表面及边缘附有数目不等的逗点状折光性很强的绿色小体, 由于在红细胞表面的虫体有张力作用, 使红细胞变形, 呈现齿轮状、狼牙棒状等; 部分小体游离于红细胞外, 作前后、左右、上下伸展、旋转、翻滚等运动, 有些带动红细胞振动, 甚至滚动; 正常红细胞边缘规则而成圆形, 无不规则运动。在40倍的物镜下, 视野中出现这种活动小体2~3个, 每个视野平均为2个, 感染强度记为轻度感染。

2.3 涂片染色镜检 于发热期无菌取耳端抗凝血,

制成血涂片, 姬姆萨氏染色镜检, 可见红细胞边缘不规则, 凹凸不平, 虫体被染成淡紫色, 折光性很强, 当调动微螺旋时, 虫体中央变亮, 形成气泡。革兰氏染色可见红细胞被染成淡红色, 虫体为革兰氏阴性; 瑞氏染色时红细胞染成紫红色, 虫体为淡蓝色。

3 治疗

应用强力霉素(50 mg/10 mL), 按每次0.5 mg/kg作深部肌肉注射, 隔天1次, 共3次。

同时配合输液对症治疗。以复方生理盐水调节电解质平衡, 使用葡萄糖治疗脱水提供能量, 以碳酸氢钠注射液纠正酸中毒; 使用青霉素联合硫酸丁胺卡那、地塞米松等抗菌消炎, 以维生素C、肝泰乐、肌苷、能量合剂等联合使用, 强心、护肝, 改善机体代谢功能; 肌肉注射复方氨基比林、维生素B₁、B₁₂、复合维生素B等药物解除机体高热状态、治疗贫血症状。

治疗后6天, 该非洲狮完全康复, 抽取其耳静脉进行血液涂片检查, 血液红细胞形态正常, 未发现附红细胞体。

4 小结与分析

4.1 附红细胞体是一种人兽共患病, 1993-1995年尚德秋等^[1]对我国附红细胞体病进行较系统的流行病学调查, 进一步证实了附红细胞体在我国人群和兽群体中感染的普遍性与广泛性, 该病隐性感染率高达95%。笔者^[2]曾在其中一个发生该病的养殖场中取2只黑猩猩、3只猴子的血液进行检查, 发现也存在较少量的虫体, 但在此后2~3年的追访中并未发现这些动物出现发病症状。因此, 附红细胞体病的临床诊断不能单以血液中检查到附红细胞体为依据, 应结合临床表现出来相关的症状进行分析。诊断依据应包括以下几点: (1) 动物应出现贫血、高热、食欲不振、消瘦等症状。(2) 显微镜下可见到大量的红细胞被感染, 红

细胞数量下降,血色素偏低、感染的红细胞出现明显的异常形态变化。(3)采集耳静脉等外周末梢血,应能观察到大量的病原体。

4.2 发病非洲狮血液涂片中观察到的虫体和红细胞的形态和其他报道有不同,可能与采血时机、动物种类、动物抵抗力、附红细胞体不同的发育时期等因素有关。

4.3 用于治疗该病的药物较多,但其中许多药物疗效不明显或副作用较大。本次治疗采用的是强



(上接第 42 页)

关节囊完全愈合,关节结构正常且关节腔内有滑液形成,表明手术疗效肯定。但 2 号犬关节囊外固定线发生断裂,使其固定股骨头于髌臼内的作用丧失。分析其原因:一是在术后关节囊愈合期内,犬过度奔跑或跳跃,有可能引起关节囊破裂和髌臼外侧固定线断裂,使股骨头向缝线一侧脱出;二是 2 号犬年龄可能偏小,随着年龄和体格增长,股骨延长必然造成髌臼外侧缝线张力增大,从而增加了缝线将股骨头拉出髌臼的可能性。至于 2 号犬术后 3 月的负重耐力良好,达到了与健肢相同的负重时间,认为是因股骨头与髌臼外缘间形成假关节、缺乏痛觉有关。

3.3 股骨头切除术的治疗效果评价 股骨头切除术的重要操作是切除股骨头,消除其与髌臼摩擦造成的疼痛刺激,并促使股骨头断端与髌臼间形成稳定的软组织联系(假关节),使术肢基本能够正常站立和行走。为了达到这个目的,在切除股骨头以后,需将周围软组织如脂肪、肌膜及肌肉组织等垫入髌臼窝,以防止骨与骨接触、摩擦,减少疼痛和有利于假关节形成。本组 2 号犬因过度兴奋,术后次日就见三脚跳、奔跑等剧烈运动,可能由于假关节尚未形成便发生股骨断面移位,术肢明显缩短,继而因不能正常负重而逐渐发生肌肉萎缩,从而始终表现明显的中度跛行。而 1 号犬于手术 3 个月以后,术肢行走步态和负重耐力达到与健肢基本相同的效果,表明手术疗效显著。

3.4 髌关节囊单纯缝合术的治疗效果评价 从实验犬术后的运动表现看,术肢运动姿势良好。剖检显示其髌关节囊愈合良好,关节液澄清,髌臼和股骨头结构正常。考虑到临床病例的髌关节圆韧带大多已经断裂,关节囊不一定完整,所以单纯缝合后必须控制患犬的运动在适度范围,限制其剧

力霉素,在治疗过程未发现有较强的副作用,对附红细胞体的抑杀作用明显。同时我们注意对症治疗,缓解症状,促进康复。

参考文献:

- [1] 尚德秋,李兰玉,栾景辉,等.附红细胞体感染人畜的流行病学调查[J].中华流行病学杂志,1995,21(3):4-6.
- [2] 陈绚姣,陈武,张马龙,等.动物园草食兽附红细胞体病的诊断与治疗[J].动物医学进展,2005,26(6):116-118.

烈运动或过度跳跃,否则有可能发生关节囊被撕裂而再次脱位。如果手术对象主要是在家居环境下饲养的小型、温顺犬,而且髌关节发育正常,髌臼有足够的深度,那么髌关节囊单纯缝合术应当可以满足治疗需要。相反,若髌关节发育不良或髌臼太浅,髌关节囊单纯缝合术显然难以维持关节正常结构,就宜选择股骨头切除术。

4 小结

4.1 人造圆韧带植入术不利于髌关节内关节滑液的蓄积,增加了动物运动中股骨头与髌臼的相对摩擦,可造成关节软骨损伤和缺失,引起关节出现长期慢性疼痛,术肢的负重能力难以恢复至正常水平。

4.2 髌关节囊外固定术不适合于正在发育的幼犬,因为存在随幼犬体格增长而发生外固定缝线断裂或将股骨头拉出髌臼的危险,其结局或因股骨头与髌臼边缘摩擦出现中度或重度跛行,或因假关节形成而表现长期的轻度跛行,且失去正常的关节外形和肢势。

4.3 股骨头切除术(人工假关节成形术)是治疗犬髌关节脱位的理想方法,术肢运动机能和负重耐力可达到与健肢基本相同的表现,而术后早期限制犬的剧烈运动、促进假关节形成是手术成功的关键。

4.4 髌关节囊单纯缝合术治疗髌关节发育正常的患犬,手术疗效可靠,尤其适用于术后能够有效限制过度运动的小型、温顺犬。

参考文献:

- [1] 姚海峰,董悦农,齐长明,等.犬髌关节人造圆韧带手术初探[J].中国兽医杂志,2005,41(7):39-40.
- [2] 林德贵.兽医外科手术学[M].北京:中国农业出版社,2004.
- [3] 汤小朋,董悦农,林德贵,等.手术治疗犬髌关节脱位[J].中国兽医杂志,1999,25(6):34-35.
- [4] 袁占奎,陈宏武,董悦农,等.犬股骨头和股骨颈切除术[J].中国兽医杂志,2006,42(5):41-42.

一例疑似猪水肿病的诊疗

温青泉, 罗英娇

(广东省梅县动物卫生监督所, 广东 梅县 514000)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)02-0052-01

2008年8月26日, 我县某乡镇农户徐某所养肉猪50头全部注射猪瘟疫苗, 8月28日出现2头突然死亡, 12头发病之后到我单位求诊。据农户反映其所养猪群在防疫期间因更换饲料(自配)导致食欲下降外无其他明显病症。笔者根据猪群发病情况、临床症状、病理剖检, 初步诊断为猪水肿病, 后经实验室检查得到确诊, 并给予治愈, 排除了农户认为防疫引起猪只死亡的怀疑。具体报道如下:

1 临床症状

经现场检查发现, 发病猪群体重约30 kg, 大多数猪精神不振、食欲下降、走路摇晃、站立困难、排干硬粪球。部分猪眼睑肿胀、结膜潮红、面部有水肿。其中有1头发病猪侧卧在地上, 张口呼吸、耳尖发紫、眼睑水肿严重、肌肉不断震动、发出嘶哑的叫声。2头刚病死猪的眼睑、齿龈水肿严重, 腹下部有轻微的水肿。

2 病理剖检

解剖病死猪尸体可见心包积液、心内膜有出血斑; 胸腹腔有多量清亮积液, 积液暴露于空气后凝成胶冻样; 肠系膜淋巴结充血、肿胀、呈红黑色, 结肠系膜水肿严重; 胃粘膜脱落、胃壁有小出血点并水肿, 特别是胃大弯部及贲门部水肿严重, 切开水肿部分可见粘膜与肌肉之间有多量淡红色胶样物质; 喉头有出血点和水肿; 其它器官未见异常。

3 实验室检查

取结肠系膜淋巴结和肠内容物作为被检材料接种于麦康凯琼脂平板, 经37℃培养24 h后挑取可疑菌落(呈粉红色)抹片, 用革兰氏染色镜检发现有两端钝圆、革兰氏阴性短杆菌; 同时挑取可疑菌落接种于鲜血琼脂平板培养基上于37℃24 h培养, 可见菌落周围有溶血环, 呈β溶血。

4 防病治病

4.1 对全群猪适当降低饲料蛋白含量, 建议控制

在16%~18%; 增加维生素A、E、C的补给, 也可用多维饮水; 适当添加青饲料。对未发病的猪用0.5 g/kg土霉素原粉拌料饲喂, 同时口服乳酸菌液。

4.2 对已发病的猪用硫酸镁15 g加水灌服或10%硫酸镁10 mL。一次肌注, 以泻去肠道内部分毒素, 同时结合对症治疗。对病情较重的个别猪用维生素C300 mg、0.1%亚硒酸钠3 mL、20%甘露醇50 mL、地塞米松5 mg、50%葡萄糖30 mL混合静注, 早晚各1次; 对病情较轻的猪用安钠加0.3克、速尿0.5 mL肌注, 同时腹腔注入50%葡萄糖30 mL、维生素C300 mg, 每天1次, 连用3天。通过上述综合治疗, 除2头病情较重的猪死亡外, 其余10头治愈, 全群猪食欲恢复正常。

5 讨论与小结

5.1 猪水肿病的发病机制是由于肠道内致病性大肠杆菌异常增殖, 成为优势菌落, 产生大量蛋白原性质的血管毒素, 由肠道吸收进入血液循环, 引起血管内皮损伤, 使毛细血管通透性升高, 引起特定组织发生水肿。本次发病是因农户更换饲料(自配)中蛋白质含量偏高引起。

5.2 本病一般建议不使用抗生素, 最好是对症治疗。因为大肠杆菌有许多亚型, 且易发生抗药性; 同时使用抗生素会加大心脏和肝脏的压力, 对于康复不利, 有时还会加速死亡。

5.3 根据猪水肿病的病因和发病机制采用有针对性防治措施, 例如饲料中添加维生素A、E、C, 增加抗应激能力; 添加酸化剂, 激活胃蛋白酶活性, 降低十二指肠内pH值, 抑制大肠杆菌异常增殖; 添加益生菌(低聚果糖)促进有益微生物的增殖等, 对于防治猪水肿病可取得显著效果。

5.4 对于有发热、食欲下降等异常症状的猪只建议不注射疫苗, 待恢复健康后再注射疫苗, 避免不必要的应激和误解。

广东畜牧业呈现稳定增长势头

2008年,广东省畜牧兽医工作成效突出,全省肉类产量411.96万吨,比上年增长6.8%;禽蛋产量32.35万吨,增长8.6%;牛奶产量13.28万吨,增长2.5%;工业饲料产量1645万吨,增长17.1%,占全国总量的比重超过1/8;畜牧业总体呈现稳定增长势头,总产值达815亿元,增长5.1%。

据省农业厅厅长谢悦新介绍,2008年广东省农牧业有效化解了雨雪冰冻灾害、局部地区发生重大动物疫情和三聚氰胺事件等严重影响,畜牧业保持持续健康发展的良好势头,现代化建设步伐加快,增长方式逐步转变,管理体制不断完善,疫病防控能力有效提高,畜禽产品产量增加、质量提升。畜牧业已成为该省不少农村地区特别是广大山区重要的支柱产业和经济增长点,成为广大农民增加收入的重要来源。

他强调,当前全省畜牧兽医事业发展不确定性因素较多,畜牧业保增长、保安全面临严峻的挑战。各级农牧部门要振奋精神,真抓实干,努力推动全省畜牧兽医事业稳定健康发展,努力实现“二个提升,五个力保”的工作目标:提升重大动物疫病防控水平,提升畜禽产品质量安全监管能力;力保畜牧业生产平稳较快增长,力保畜产品有效供给,力保畜牧业结构有序调整,力保促进农民持续增收,力保重大动物疫病少发生不流行,保障畜牧业生产安全和公共卫生安全。要坚持做到“六个常抓不懈”,坚持把强化重大动物疫病防控作为畜牧兽医工作的重中之重常抓不懈;坚持把保障畜产品有效供给作为畜牧兽医工作的首要目标常抓不懈;坚持把加快转变发展方式作为畜牧业可持续发展的重要措施常抓不懈;坚持把畜产品质量安全监管作为畜牧兽医工作的重要任务常抓不懈;坚持将强化自身能力建设,切实转变工作作风作为建立健全畜牧兽医工作长效机制的重要途径常抓不懈;坚持将认真落实《珠江三角洲地区改革发展规划纲要》作为推进全省畜牧兽医工作的重要抓手常抓不懈。

(信息来源:<http://www.gdagri.gov.cn/>)

《兽医临床难病新解》简介

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

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

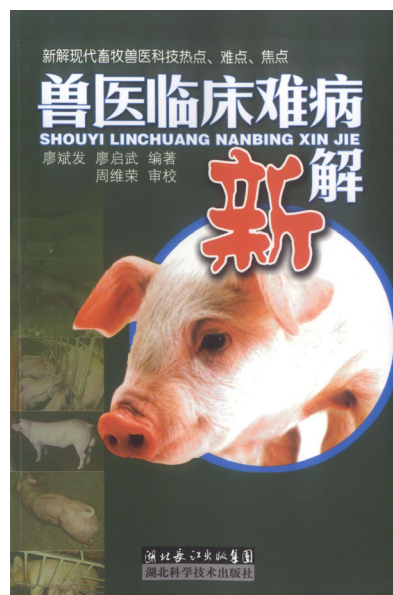
附言:该书售价35元/本(含包装邮费)需要者从邮局汇款

汇款地址:湖北省天门市根瘟灵研究所(天门市马湾镇人民大道33号) 廖斌发收。 邮 编:431715

汇单附言栏内注明“难病新解”。

联系电话:0728-4561354(兼传真)

手 机:13872992321、13707222763



《广东畜牧兽医科技》征稿启事

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

1 征稿要求

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

2 文稿书写格式

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

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

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

彭礼繁¹,罗光彬¹,李东全¹,陈自洪²,石德顺²

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

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

2.5 关键词 一般选用 3~8 个能反映论文主要内容的单词或术语。

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

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

2.8 计量单位 采用国家法定计量单位。

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

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

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

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

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

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

3 声明和约定

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

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

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

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

3.5 来稿时请注明作者详细地址、邮政编码和联系电话,以便联系。

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

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