

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第47卷 第5期 (总第225期)

2022年10月18日出版

中国标准连续出版物号 $\frac{\text{ISSN } 1005-8567}{\text{CN } 44-1243/S}$

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院动物卫生研究所

广东省畜牧兽医学会

编辑委员会

编委主任:廖明

编委副主任:罗成龙 孙铭飞 卢受昇

编委(排名按姓氏笔画):

马现永 王刚 王丽 王贵平

王修启 元文宝 巨向红 邓百川

石达友 卢受昇 卢桂强 田允波

宁章勇 吕殿红 任涛 向华

向荣 江青艳 孙永学 孙铭飞

李加琪 杨琳 吴珍芳 吴银宝

张永亮 张建峰 张细权 张哲

张桂红 陈卫东 陈金顶 陈瑞爱

陈瑶生 林德锐 林鑫 罗成龙

郑春田 赵志辉 聂庆华 徐志宏

郭世宁 唐兆新 黄运茂 黄显会

黄淑坚 黄燕华 曹永长 曹伟胜

曹俊明 彭国良 蒋守群 蒋宗勇

舒鼎铭 曾振灵 简纪常 蔡更元

管武太 廖明 廖新倮 翟少伦

魏文康 瞿浩

编辑部

主编:廖明

副主编:王刚 郑春田

主任:马新燕

编辑:康桦华 吕晓慧 张洁华 邢亚琪

王片片 张锦宁 郭婷婷

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大丰一街1号(510640)

电话:020-87576452

E-mail:gdxmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

国内定价:10.00元/册

广告发布登记通知书编号:440100190079

目次

·试验研究·

饲料中添加柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能、肠道免疫功能和菌群结构的影响

..... 林厦菁,茅沈丽,等(1)

广西瑶鸡体重、内脏器官生长发育规律的研究..... 贾玉生,瞿孝云,等(6)

正交法比较两种新会柑果肉中总黄酮提取工艺..... 容庭,马新燕,等(13)

水提工艺对裸花紫珠主要有效成分的影响..... 曾富兰,傅嘉莉,等(18)

间接免疫荧光检测猪瘟活疫苗效价方法的建立..... 陈建凯,张璞,等(23)

HPLC-MS/MS同位素内标法测定鸡蛋中14种喹诺酮类药物残留量..... 刘佩怡,伍宏凯,等(28)

·专题综述·

猪流行性腹泻及其疫苗研究现状..... 应碧云,朱利塞,等(35)

水葫芦饲料资源化研究进展..... 凌欣华,刘兴隆,等(41)

·兽医临床·

肉种鸡核心群禽白血病净化实践报告..... 蔡曼珊,严霞,等(46)

丙泊酚麻醉对犬生理指标的影响..... 龙海斌,杜志国,等(50)

犬慢性支气管炎的诊治报告..... 罗子鹏,丁庆宇,等(54)

一例田园猫肠道线性异物的诊治..... 吴志文,黄碧霞,等(59)

一例犬乳腺肿瘤的诊治..... 张志宏,周方军,等(64)

·简报·

兽医实验室ELISA检测中常见问题的探讨..... 黄丽菊,何奇松,等(68)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

October 2022 Volume 47, Number 5 (Total No.225)

Contents

Effects of dietary supplementation with citric acid on growth performance, intestinal immunity and microflora structure of yellow-feathered broilers	LIN Xiajing, MAO Shenli, et al(1)
Study on the growth and development of body weight and visceral organs of Guangxi Yao chicken	JIA Yusheng, QU Xiaoyun, et al(6)
Comparison of two common technology of total flavonoids extraction from xinhui tangerine pulp by orthogonal method	RONG Ting, MA Xinyan, et al(13)
Effects of water extraction technology on the major active components of Callicarpa nudiflora	ZENG Fulan, FU Jiali, et al(18)
Development of an indirect immunofluorescence assay for typical Swine Fever live vaccine	CHEN Jiankai, ZHANG Pu, et al(23)
Determination of 14 quinolones residues in eggs by HPLC-MS/MS with isotopic internal standard	LIU Peiyi, WU Hongkai, et al(28)
Research progress of porcine epidemic diarrhea and its vaccine	YING Biyun, ZHU Lisai, et al(35)
Research progress in utilization of eichhornia crassipes as feed resource	LING Xinhua, LIU Xinglong, et al(41)
Report on avian leukosis viruses eradication in nucleus flocks of chicken breeds	CAI Manshan, YAN Xia, et al(46)
Effect of intravenous protocol on canine physiological index	LONG Haibin, DU Zhiguo, et al(50)
A case report of canine chronic bronchitis	LUO Zipeng, DING Qingyu, et al(54)
Diagnosis and treatment of linear intestinal foreign body in a felis catus	WU Zhiwen, HUANG Bixia, et al(59)
Diagnosis and treatment of a canine breast tumor	ZHANG Zhihong, ZHOU Fangjun, et al(64)
Discussion on common problems of ELISA test in veterinary laboratory	HUANG Liju, HE Qisong, et al(68)

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

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

Chief Editor: Liao Ming

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

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

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

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

饲料中添加柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能、 肠道免疫功能和菌群结构的影响

林厦菁, 茅沈丽, 叶金玲, 苟钟勇, 王一冰, 范秋丽, 蒋守群*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 农业部农村部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东广州 510640)

摘要:本试验旨在研究柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能、免疫功能的影响。选用320只1日龄健康发育良好的快速型麻黄鸡(公、母各半),按照体重一致原则随机分为2个处理组,每处理8个重复,每重复20只鸡,基础饲料中分别添加0、120 mg/kg 柠檬酸。试验鸡自由采食和饮水,试验期共21天。试验结果显示,空白对照组和柠檬酸组试验鸡日增重、采食量和料重比均无显著差异($P>0.05$);与对照组相比,柠檬酸组日增重提高0.52%,采食量提高1.57%,料重比提高0.60%。饲料中添加柠檬酸对黄羽肉鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏指数无显著影响($P>0.05$);与对照组相比,柠檬酸组的心脏指数提高1.56%,肝脏指数提高25%,肺脏指数提高0.98%,肾脏指数降低3.28%。饲料中添加柠檬酸对试验鸡空肠黏膜的免疫因子IL-6、IL-8、IL-10、IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 、sIgA的含量均无显著影响($P>0.05$);与对照组相比,柠檬酸组的空肠黏膜免疫因子IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 、sIgA、TNF- α 的含量分别提高17.54%、10.95%、3.30%、4.59%、0.77%、28.35%、10.48%。饲料中添加柠檬酸会显著降低试验鸡空肠的绒毛高度和隐窝深度($P<0.05$),但对空肠的绒隐比无显著影响($P>0.05$);显著降低回肠绒毛高度($P<0.05$),绒隐比比对照组高14.7%($P>0.05$)。添加柠檬酸对试验鸡盲肠微生物菌群组成无显著影响($P>0.05$),与对照组相比,柠檬酸组盲肠中大肠杆菌、沙门氏菌、乳酸杆菌和双歧杆菌的水平分别提高0.91%、4.14%、0.14%、0.84%;总菌数降低0.19%。综合以上所有试验结果说明黄羽肉仔鸡饲料中添加120mg/kg的柠檬酸,对其生长性能、肠道细胞因子含量和盲肠菌群结构均无显著影响,对回肠黏膜形态结构有一定改善作用。

关键词:柠檬酸; 黄羽肉鸡; 肠道形态结构; 细胞因子

中图分类号:S831.5 文献标识码:A 文章编号:1005-8567(2022)05-0001-05

Effects of dietary supplementation with citric acid on growth performance, intestinal immunity function and microflora structure of yellow-feathered broilers

LIN Xiajing, MAO Shenli, YE Jinling, GOU Zhongyong, WANG Yibing, FAN Qiuli, JIANG Shouqun*

收稿日期:2022-04-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系(CARS-41-G10);广东省重点领域研发计划项目(2020B0202090004);国家重点研发专项(2021YFD300404);国家自然科学基金青年基金(31802104);广东省自然科学基金项目(2021A1515012412、2021A1515010830);广东省农业科学院科技计划项目(202106TD、R2019PY-QF008)

作者简介:林厦菁,女,助理研究员,从事黄羽肉鸡营养与饲料科学研究。E-mail: 93783419@qq.com

*通讯作者:蒋守群,女,博士,研究员,从事黄羽肉鸡营养与饲料科学研究。E-mail: jsqun3100@sohu.com

(Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou Guangdong 510640)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of citric acid on growth performance and immune function of yellow-feathered broiler. A total of three hundred and twenty 1-day-old yellow-feathered broilers (male and female half) were randomly divided into 2 groups with 8 replicate of 20 birds per replicate. The basal diets were supplemented with 0 and 120 mg/kg citric acid, respectively. The experiment lasted for 21 days. The results showed that dietary citric acid supplementation had no significant effect on the ADG, ADFI, and F/G ($P>0.05$) compared with the control group, the ADG of citric acid group increased by 0.52%, ADFI increased by 1.57%; F/G increased by 0.60%. Citric acid had no significant effects on the heart, liver, spleen, lung, and kidney indexes of yellow-feathered broilers at 21 days of age ($P>0.05$) compared with the control group, the heart index of the citric acid group increased by 1.56%, liver index increased by 25%, lung index increased by 0.98%, renal index decreased by 3.28%. Compared with the control group, dietary supplementation with citric acid had no significant effects on the contents of IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α and sIgA in jejunum mucosa ($P>0.05$), the contents of jejunum mucosal immune factors IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , sIgA and TNF- α in citric acid group were increased by 17.54%, 10.95%, 3.30%, 4.59%, 0.77%, 28.35% and 10.48%, respectively. Dietary supplementation with citric acid significantly decreased the villus height and crypt depth of jejunum ($P<0.05$), while had no significant effect on the villus height to crypt depth ratio of jejunum ($P>0.05$). The ileum villus height was significantly decreased ($P<0.05$), but the villus height to crypt depth ratio was 14.7% higher than that of the control group ($P>0.05$). Dietary supplementation with citric acid had no significant effect on cecal microflora composition ($P>0.05$) compared with the control group, the number of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* in cecum of citric acid group were increased by 0.91%, 4.14%, 0.14% and 0.84%, respectively, while the number of total bacteria decreased by 0.19%. In conclusion, dietary supplementation with 120 mg/kg citric acid has no significant effects on growth performance, the content of intestinal cytokine and cecal bacterial number of yellow-feathered broilers, while has certain improvement on ileum mucosal morphology.

Keywords: Citric acid; Yellow-feathered broiler; Intestinal morphology; Cytokine

在饲料“禁抗”和环保的要求下,酸化剂在养殖业中的作用更加的广泛和重要,从最开始的防止腹泻和促进消化吸收,到现在的饮水消毒和饲料防霉。其中柠檬酸是有机酸化剂中效果较好一种饲料添加剂,具有高效、无污染和无残留等优点。添加柠檬酸可以提高生长性能,对改善肉仔鸡的肠道微生态和小肠黏膜形态结构有一定作用,同时还能提高饲料中矿物质的利用率,减少对环境的污染^[1-3]。目前对于柠檬酸的研究主要集中在蛋鸡和白羽肉鸡,同时关于柠檬酸对于肉鸡肠道免疫功能的影响也鲜少报道。因此,本试验通过对生产性能、肠道免疫功能、菌群结构等指标的探讨柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能、肠道免疫功能的影响,为柠檬酸在黄羽肉鸡生产应用提供理论参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验动物与分组

试验采用单因子试验设计,选用320只1日龄健康发育良好的快速型麻黄鸡(公、母各半),按照体重一致原则(公、母分别称重)随机分为2个处理组,每个处理组8个重复,每个重复20只鸡,基础饲料中添加0、120 mg/kg柠檬酸。试验期21天。

1.2 试验饲料

试验采用玉米-豆粕型基础饲料(颗粒料)。试验饲料营养水平参考《黄羽肉鸡营养需要量》(NY/T3645-2020)标准快速型黄羽肉鸡的营养需要量参数,科学配制试验饲料。见表1。

1.3 饲养管理

试验鸡采用地面平养,垫料使用清洁卫生的

表1 试验饲料组成及其营养成分(%)

原料组成	含量
玉米	58.1
大豆粕	34.2
玉米蛋白粉	2
大豆油	1
赖氨酸	0
蛋氨酸	0.14
苏氨酸	0
石粉	1.1
磷酸氢钙	2.16
氯化钠	0.3
沸石粉	0
预混料 ¹⁾	1
合计	100
营养水平	
氮校正代谢能 MJ/kg ²⁾	11.92
粗蛋白质 ³⁾	20.83
粗脂肪 ³⁾	3.53
钙 ³⁾	0.98
总磷 ³⁾	0.76
非植酸磷 ²⁾	0.46
赖氨酸 ²⁾	1.08
蛋氨酸 ²⁾	0.47
苏氨酸 ²⁾	0.8

注:1)预混料为每千克饲料提供:VA 12,000 IU;VD 3600 IU;VE 45 mg;VK₃ 6 mg;VB₁ 3.0 mg;VB₂ 9.0 mg;VB₆ 6.0 mg;VB₁₂ 30 μg;烟酸 60 mg;D-泛酸 18 mg;叶酸 1.5 mg;生物素 0.36 mg;氯化胆碱 600 mg;抗氧化剂 150 mg;防霉剂 1400 mg;铁 80 mg(硫酸亚铁);铜 7 mg(硫酸铜);锌 75 mg(硫酸锌);锰 100 mg(硫酸锰);硒 0.15 mg(亚硒酸钠);碘 0.35 mg(碘化钾)。2)计算值,参照《黄羽肉鸡营养需要量》(NY/T3645-2020)计算营养水平。3)实测值。

谷壳。室温:1周龄 32~34 °C,从第2周起,每周下降 2~3 °C;湿度保持 70%左右。其他按照常规饲养操作规程饲养和常规免疫程序免疫。试验期间,安排专人负责饲养,鸡只自由采食饮水,保持禽舍清洁卫生。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 生长性能

在试验鸡 21 日龄前一天晚 20:00 断料不断水,于次日上午 8:00 以重复为单位称重、结料,准确记录给料量和剩料量,统计试验期肉鸡的平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)和料重比。

每天观察鸡只健康情况和粪便情况,统计各处理试验鸡的死亡率。

1.4.2 器官指数测定

21 日龄时,每个重复选取 1 只试验鸡(每组公鸡、母鸡各 4 只)进行称重,然后完整剖离心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏称重,计算各器官与体重的比值。

1.4.3 肠道粘膜炎症因子

21 日龄时,每重复取 1 只试验鸡(每组公鸡、母鸡各 4 只),采集取空肠粘膜样,采用 Elisa 法使用多功能酶标仪(spectra max M-5, Molecular Devices 公司,美国),测定其中 IFN- γ 、IL-10、IL-1 β 、IL-8、sIgA、IL-6、TNF- α 含量,试剂盒采购于江苏麦莎实业有限公司。

1.4.4 肠道组织切片观测

21 日龄时,每重复选取 1 只试验鸡(每组公鸡、母鸡各 4 只),剪取空肠、回肠肠段中段样,使用多聚甲醛对组织进行固定,制作石蜡切片,进行 HE 染色,显微镜镜检,图像采集分析,观察肠绒毛形态结构,测定空肠绒毛高度和隐窝深度,计算绒毛高度与隐窝深度的比值(绒隐比)。

1.4.5 肠道菌群指标评估

21 日龄,每重复取 1 只试验鸡(每组公鸡、母鸡各 4 只),剪取盲肠,采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)手提法提取盲肠样本基因组 DNA。以样品基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物和 518R 扩增样品 16S rDNA 的 V3 区序列。将 PCR 产物进行变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析。DGGE 完毕后,采用银染法染色。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction 试剂盒纯化回收。采用 Quantity one 分析软件包对 DGGE 图谱的电泳条带数目、条带密度进行数字化分析。再将 DGGE 图谱中优势条带进行回收,对(总菌、大肠杆菌、乳酸菌、沙门氏菌和双歧杆菌)测序,将提取的 DNA 上 PCR 仪(TIB8600,泰普生物科学有限公司,中国)检测,根据样品 Ct 值和标准曲线计算出各样品菌群数量,再换算成每克样品中细菌拷贝数的 lg 值。

1.5 数据处理与统计分析

试验数据采用 SAS 软件(V8.0, SAS INSTITUTE, USA)一般线性模型 GLM 程序进行单因素方差分析,并对试验数据进行 Duncan 氏进行多重比较,统计显

著水平为 $P < 0.05$, 试验数据均以平均值和均值标准误(SEM)表示。

2 结果分析

2.1 柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能的影响

由表2可知, 1-21日龄, 对照组和柠檬酸组试验鸡日增重、采食量和料重比均无显著差异($P > 0.05$)。与对照组相比, 柠檬酸组日增重提高0.52%, 采食量提高1.57%, 料重比提高0.60%。

表2 柠檬酸对黄羽肉鸡生长性能的影响

组别	对照组	柠檬酸 120 mg/kg	SEM	P 值
1日龄体重, g	37.62	37.63	0.11	1
21日龄体重, g	402.07	404.05	3.34	0.78
日增重, g	17.36	17.45	0.16	0.78
采食量, g	28.7	29.15	0.14	0.11
料重比	1.66	1.67	0.01	0.6
死亡率%	0	0	-	

注: 同行数据无字母或肩标字母有相同表示差异不显著($P > 0.05$), 肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 柠檬酸对黄羽肉鸡21日龄器官指数的影响

由表3可知, 饲料中添加柠檬酸对21日龄黄羽肉鸡的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏指数无显著影响($P > 0.05$)。与对照组相比, 柠檬酸组的心脏指数提高1.56%, 肝脏指数提高25%, 肺脏指数提高0.98%, 肾脏指数降低3.28%。

表3 柠檬酸对黄羽肉鸡21日龄器官指数的影响

组别	对照组	柠檬酸 120 mg/kg	SEM	P 值
心脏, %	0.64	0.65	0.028	0.83
肝脏, %	2.8	2.97	0.058	0.14
脾脏, %	0.12	0.15	0.01	0.22
肺脏, %	0.61	0.59	0.016	0.5
肾脏, %	1.02	1.01	0.019	0.86

2.3 柠檬酸对黄羽肉鸡肠道粘膜免疫因子的影响

由表4可知, 饲料中添加柠檬酸对21日龄试验鸡空肠粘膜的免疫因子IL-6、IL-8、IL-10、IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 、sIgA的含量均无显著影响($P > 0.05$)。与对照组相比, 柠檬酸组的空肠粘膜免疫因子IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ 、sIgA、TNF- α 的含量分别提高17.54%、10.95%、3.30%、4.59%、

0.77%、28.35%、10.48%。

表4 柠檬酸对黄羽肉鸡空肠粘膜免疫因子的影响

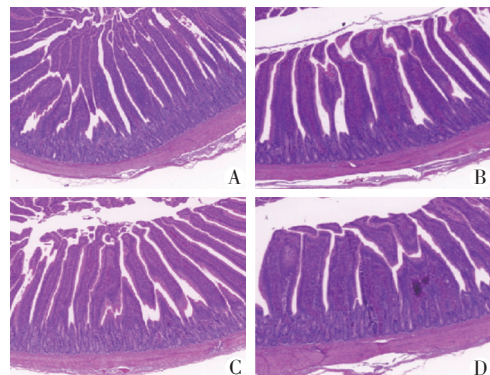
组别	对照组	柠檬酸 120 mg/kg	SEM	P 值
IL-1 β , ng/gprot	2.28	2.68	0.15	0.2
IL-6, ng/gprot	2.74	3.04	0.19	0.46
IL-8, ng/gprot	6.66	6.88	0.42	0.8
IL-10, ng/gprot	6.53	6.83	0.51	0.78
IFN- γ , ng/gprot	7.83	7.89	0.52	0.96
sIgA, ng/gprot	2.54	3.26	0.23	0.12
TNF- α , ng/gprot	7.06	7.8	0.48	0.46

2.4 柠檬酸对黄羽肉鸡肠道黏膜结构的影响

由表5可知, 饲料中添加柠檬酸会显著降低试验鸡空肠的绒毛高度和隐窝深度($P < 0.05$), 但对空肠的绒隐比无显著影响($P > 0.05$); 显著降低回肠绒毛高度($P < 0.05$), 但绒隐比比对照组高14.7%($P > 0.05$)。空肠和回肠组织切片图如图1所示, 对照组的空肠和回肠绒毛高度显著高于柠檬酸组。

表5 柠檬酸对黄羽肉鸡肠道黏膜结构的影响

组别	对照组	柠檬酸 120 mg/kg	SEM	P 值
空肠				
绒毛高度, mm	0.90 ^a	0.74 ^b	0.03	0.003
隐窝深度, mm	0.10 ^a	0.08 ^b	0.04	0.022
绒隐比	11.28	11.93	0.76	0.673
回肠				
绒毛高度, mm	1.08 ^a	0.94 ^b	0.23	0.034
隐窝深度, mm	0.11	0.09	0.48	0.166
绒隐比	11.27	12.93	0.71	0.244



注: A: 对照组空肠; B: 柠檬酸组空肠; C: 对照组回肠; D: 柠檬酸组回肠

图1 柠檬酸对黄羽肉鸡肠道黏膜结构的影响(HE切片)

2.5 柠檬酸对黄羽肉鸡盲肠微生物菌群组成的影响

由表6可知,添加柠檬酸对21日龄试验鸡盲肠微生物菌群组成无显著影响($P>0.05$)。与对照组相比,柠檬酸组盲肠中大肠杆菌、沙门氏菌、乳酸杆菌和双歧杆菌的水平分别提高0.91%、4.14%、0.14%、0.84%,总菌数降低0.19%。

表6 重组人溶菌酶对黄羽肉鸡盲肠微生物菌群组成的影响

组别	对照组	柠檬酸 120 mg/kg	SEM	P值
大肠杆菌, lg(copy/g)	8.81	8.89	0.15	0.81
乳酸杆菌, lg(copy/g)	6.28	6.54	0.2	0.54
双歧杆菌, lg(copy/g)	6.93	6.94	0.13	0.96
沙门氏菌, lg(copy/g)	5.97	6.02	0.1	0.8
总菌数, lg(copy/g)	10.5	10.48	0.1	0.94

3 讨论

本试验研究发现黄羽肉鸡饲料中添加柠檬酸对日增重有提高趋势但并不显著,这与马书宇(2002)的研究在白鸡饲料中添加1.0%柠檬酸可以促进生长性能的结果不一致^[4]。高山林等(2004)的试验结果表明添加0.1%柠檬酸对肉仔鸡的料重比和日增重无显著影响^[5]。孔宪军等(2000)研究表明在蛋鸡日粮中添加0.05%柠檬酸,可以增加日增重和饲料利用率^[6]。说明柠檬酸的作用与鸡的品种、类型和添加水平均有关。

柠檬酸能够降低胃肠道pH值,从而抑制有害微生物的繁殖,同时促进有益菌的增殖。有研究发现,肉仔鸡饲料中添加柠檬酸可以改变盲肠的pH值,但对盲肠的沙门氏菌含量没有影响^[7]。研究发现在蛋鸡饲料中添加柠檬酸可以降低盲肠中大肠杆菌数,提高乳酸杆菌数量,但是这种作用随着日龄的增加而减少^[8]。在肉鸡上的研究发现,在饲料中添加高剂量的柠檬酸能够显著提高42日龄盲肠中有益菌的数量,减少有害菌的数量^[3]。本试验的结果显示,添加柠檬酸对黄羽肉仔鸡盲肠的菌群结构无显著作用,说明柠檬酸对于肠道菌群的作用与柠檬酸添加量和鸡的日龄均相关。

肠道绒毛是家禽肠道吸收营养物质的特有结构,它的高度和隐窝深度直接影响着肠道的吸收

水平。绒毛高时,成熟细胞较多,养分吸收能力强;隐窝深度浅,表明细胞成熟率增多,分泌功能增强,所以绒隐比越高,肠道的消化吸收能力更强。本试验中虽然肠道的绒毛高度有显著降低,但是隐窝深度也降低,绒隐比与对照组无差异,且回肠绒隐比比对照组高14.7%。研究发现,给饲料中添加柠檬酸可以显著提高肉仔鸡十二指肠绒毛高度和隐窝深度^[9]。李俊良等(2012)研究报道在肉仔鸡饲料中添加柠檬酸能够显著提高十二指肠绒毛高度,提高绒隐比但不显著^[2]。说明柠檬酸对于黄羽肉仔鸡肠道黏膜形态结构有一定改善作用。

细胞因子在机体免疫和炎症反应中起着重要的作用,它也是肠道屏障健康的重要影响因素。促炎因子IL-6、IL-8、IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 等大量释放对肠道完整性和肠道屏障功能都造成损伤^[10]。sIgA、IL-10等抗炎因子可以通过抑制促炎因子表达或阻止细菌或病毒在肠粘膜表面定植来保护肠道屏障^[11-12]。目前对于柠檬酸对于肉鸡肠道黏膜细胞因子的影响研究鲜见报道。本试验结果显示,黄羽肉仔鸡饲料中添加柠檬酸对空肠黏膜细胞因子的含量无显著作用。分析原因可能是健康动物体内促炎因子和抗炎因子水平是保持动态平衡的,由于本试验条件下,动物都处于健康状态,柠檬酸的作用效果不明显。

4 小结

饲料添加120 mg/kg柠檬酸对黄羽肉鸡雏鸡生长性能、肠道细胞因子含量和盲肠菌群结构均无显著影响,对回肠黏膜形态结构有一定改善作用。

参考文献:

- [1] 任莹,胡文琴,李桂冠,等. 氨基乙酰丙酸和柠檬酸对肉鸡生长性能、免疫器官指数和血液指标的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2019, (5):38-41.
- [2] 李俊良,王淑琴,史彬林. 柠檬酸对肉仔鸡生长性能、肠道菌群、肠黏膜形态及血液相关指标的影响[C]//中国畜牧兽医学动物营养学会第十一次全国动物营养学术研讨会论文集, 2012:587.
- [3] 蒋秀全. 柠檬酸对肉鸡肠道pH值与微生物数量的影响[J]. 养殖技术顾问, 2011, (9):224-225.
- [4] 马书宇. 柠檬酸对肉仔鸡肠道pH值及肠道微生物的影响[J]. 饲料工业, 2002, (10):28-30.
- [5] 高山林,孙素霞,邵翠红. 日粮中添加柠檬酸对蛋鸡产蛋性

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.02

广西瑶鸡体重、内脏器官生长发育规律的研究

贾玉生¹, 瞿孝云¹, 李毅², 廖明¹, 蒋维维^{1, 2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 广西鸿光农牧有限公司, 广西 玉林 537500)

摘要: 本文旨在研究在广西鸿光农牧有限公司饲养管理规程下瑶鸡体重和内脏器官的生长发育规律。0~15周, 每周末随机抽取公鸡120只, 母鸡120只, 称量每只鸡的体重并记录。随机抽取公鸡和母鸡各5只, 解剖后测定心脏、肝脏、脾脏、腺胃、肌胃、法氏囊、胰腺和肠道等主要组织器官的生长发育情况, 以器官指数表示。结果显示, 第2周龄公鸡和母鸡的体重呈现显著性差异($P<0.05$), 其余周龄公鸡和母鸡的体重差异极显著($P<0.01$)。公鸡的13.71周龄和母鸡的12.59周龄是瑶鸡的生长拐点周龄, 拐点体重分别为2238.17 g和1575.96 g。公鸡母鸡的器官指数变化规律一致, 公鸡和母鸡的心脏、肌胃、腺胃、肝脏均在第一周的指数最大, 随后逐渐减小。由此可见, 广西瑶鸡优先发育心脏、肝脏、胃等重要代谢及消化器官, 为生长前期快速吸收营养, 增长体重奠定基础。这提示, 应加强前13周鸡饲料营养配比的全价和平衡管理, 以提高瑶鸡的生长效率。

关键词: 瑶鸡; 体重; 内脏器官; 生长发育

中图分类号: S831.6 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)05-0006-07

Study on the growth and development law of body weight and internal organs of Guangxi Yao chicken

JIA Yusheng¹, QU Xiaoyun¹, LI Yi², LIAO Ming¹, JIANG Weiwei^{1, 2*}

(1. College of veterinary medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642;

2. Guangxi Hongguang agriculture and animal husbandry Co., Ltd., Yulin, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 537500)

Abstract: This study aimed to research the growth and development of Yao chicken's weight and organ under the management procedures of Hongguang agriculture and animal Husbandry Co., Ltd. From 0 to 15 weeks, 120 cocks and 120 hens were randomly selected to weigh and record their body weight every weekend. Thereafter, 5 cocks and 5 hens were randomly selected, and the growth and development of main tissues and organs, such as heart, liver, spleen, glandular stomach, muscular stomach, bursa of Fabricius, pancreas and intestine were measured. Results showed that there was significant difference ($P<0.05$) in body weight of cocks and hens between 2 weeks of age. Meanwhile, there was significant difference ($P<0.01$) in body weight between cocks and hens in other weeks. The growth inflection points of cocks and hens of Yao chickens were 13.71 weeks and 12.59 weeks, respectively, and their body weight t were 2238.17 g and 1575.96 g, respectively. The change trend of organ index of cocks and hens are consistent. The relative indexes of heart, muscle stomach, glandular stomach, and liver of cocks and hens were higher

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系(CARS-41-G16); 沃尔玛基金会(61626817); 沃尔玛基金会项目(52514289)

作者简介: 贾玉生(1999-), 男, 硕士研究生在读, 研究方向为预防兽医。E-mail: jiaiyusheng0922@163.com

*通讯作者: 蒋维维(1989-), 女, 兽医师, 研究方向为动物遗传育种与疫病净化。E-mail: megan2424@163.com

in the first week, and then decreased gradually. This study showed that Yao chickens give priority to the development of heart, liver, stomach and other important organs, which can contribute to nutrient absorption and increasing body weight in the early growth stage. This study also suggested that the full price and balance of nutritional ratio before 13 weeks should be strengthened in order to improve growth efficiency of Yao chickens.

Keywords: Yao chicken; Body weight; Internal organs; Growth and development

广西省是地方鸡品种最丰富的省份之一,优质的地方鸡品种支撑了我国家禽的选育和展^[1]。万火福、翁茁先分别做出了广西三黄鸡和五华三黄鸡的生长曲线拟合,揭示了三黄鸡的生长发育规律,分析出该品种最佳上市时间在16周左右^[2-3]。刘聪、邹剑敏做出了麻鸡的体重和胫长生长曲线拟合,研究发现Logistic模型对胫长的拟合效果最好,为麻鸡选育提供参考^[4-5]。广西瑶鸡是地方名鸡,耐粗饲料,适应性广,抗病力强,肉质细嫩,味道鲜美,口感好。但是鲜有对瑶鸡的体重和器官生长发育规律的研究。体重能显著的影响性成熟,有研究表明,体重越小,性成熟时间越晚,因此研究瑶鸡的体重生长发育规律可为制定合理的饲养标准,生产效益的提高提供理论参考依据^[6]。生长曲线可用来描述体重随时间增长而变化的规律,Logistic曲线模型常用来进行生长曲线拟合, R^2 越接近1,表明拟合效果越好。内脏器官发育状况可影响家禽健康状态,脏器指数可以提示瑶鸡所处发育阶段,法氏囊和脾的相对质量可评价家禽的免疫系统情况^[7]。本试验以瑶鸡为研究对象,通过测定0~15周龄瑶鸡的体重和主要器官重量,研究瑶鸡在广西鸿光农牧有限公司饲养管理规程下的生长发育规律,帮助建立广西瑶鸡生理指标背景数据库,同时为瑶鸡的生长发育规律进一步研究提供科学依据。

1 材料与方

1.1 试验鸡群

试验地点在广西鸿光农牧有限公司凤凰谷种鸡场进行。试验期间饲养管理按照鸿光公司饲养管理规程执行。同一批瑶鸡出雏后,翻肛鉴别公母,并带上翅号,运输至育雏舍饲养。

1.2 饲养管理

试验开始为40只瑶鸡每笼,逐渐过渡至15周龄的5只每笼,随着周龄的增加,减小笼内的饲养

密度,饲喂广西鸿光农牧有限公司提供的全价配合饲料,具体饲料组成及营养水平,见表1。鸡只全程笼养,自由采食和饮水,免疫按照公司制定的免疫程序严格执行,每日观察鸡群动态,解剖死亡鸡。

表1 基础饲料组成及营养水平

饲料组成	周龄/w	
	0-6	7-15
玉米/%	57.9	60.9
豆粕/%	26.6	24.6
麦皮/%	2.5	2.5
进口鱼粉/%	1.5	
次粉/%	2	2
碳酸钙/%	6	6.2
磷酸氢钙/%	1.7	2
氨基酸/%	0.7	0.7
维生素/%	0.6	0.6
微量元素/%	0.5	0.5
合计/%	100	100
营养水平		
代谢能(MJ/kg)	11.93	11.68
粗蛋白/%	20.5	17.6
钙/%	1.2	1.2
总磷/%	0.66	0.63
赖氨酸/%	1.09	0.91
蛋氨酸/%	0.47	0.44

1.3 检测指标及方法

在0~15周龄内,从出雏开始,每周末空腹12小时,随机抽取公鸡120只,母鸡120只,称量每只鸡的体重并记录。称量体重后,随机抓取公鸡母鸡各5只,带至解剖室解剖。采用空气注射法致死试验鸡,测定心脏、肝脏、脾脏、腺胃、肌胃、法氏囊、胰腺和肠道等主要组织器官的生长发育情况,并记录数据,评价器官指数(器官重量/活鸡体重)。

1.4 拟合曲线分析

用 Logistic 模型对其体重增长规律进行拟合, 模型表达式见表 2。

表 2 Logistic 生长模型参数

表达式	拐点体重/g	拐点周龄/w
$Y=A/(1+Be^{-kx})$	A/2	(lnB)/k

1.5 数据处理

瑶鸡的体重和器官指数用 Excel 2010 整理, 利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析和成对样本 T 检验, 结果以平均值 ± 标准差表示。利用 SPSS25.0 统计分析软件求出 logistic 模型的参数 k、A、B 的最优估计值。

2 结果与分析

2.1 0~15 周龄瑶鸡的生长发育规律

公鸡和母鸡在同一发育阶段, 体重差异明显, 其中第 2 周龄公鸡母鸡体重呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。其余周龄公鸡母鸡体重呈现极显著性差异 ($P < 0.01$)。第 1、2 周龄时母鸡体重明显大于公鸡, 第 2 周开始, 黑瑶公鸡生长速度加快, 第 3~15 周龄, 公鸡体重明显大于母鸡。此外, 公鸡和母鸡的体重随着周龄的增加而增加, 且各周龄之间互相呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。公鸡和母鸡在第 10 周龄时体重下降, 可能是抽鸡存在误差导致, 见表 3。由 logistic 曲线拟合方程结果可知, 公鸡 K 值大于母鸡, 说明公鸡生长潜力大于母鸡。广西瑶鸡公鸡和母鸡生长发育的拐点周龄分别为 13.71 周龄和 12.59 周龄, 拐点体重分别为 2238.17g 和 1575.96g, 见表 4。

2.2 0~15 周龄瑶鸡主要脏器指数及发育规律比较

从表 5 和表 6 可知, 公鸡和母鸡的各个器官的绝对重量都在稳步增长, 个别器官在某些周龄呈现下降趋势, 可能与测定指标抽取鸡的大小有关。

将公鸡、母鸡器官重量或长度进行差异性分析发现: 2 周龄时母鸡法氏囊重显著大于公鸡 ($P < 0.01$); 3 周龄时公鸡心脏重显著大于母鸡 ($P < 0.05$); 5 周龄时公鸡心脏重、肝脏重、脾脏重、法氏囊重均显著大于母鸡 ($P < 0.05$); 8 周龄时公鸡心脏重显著大于母鸡 ($P < 0.05$); 11 周龄时公鸡心脏重,

表 3 1-15 周瑶鸡体重变化表

周龄/w	体重/g	
	公	母
1	59.05±8.28 ^a	66.38±9.59 ^{a**}
2	143.81±28.11 ^b	150.32±17.23 ^{b*}
3	285.82±52.90 ^c	261.77±42.02 ^{c**}
4	424.38±65.36 ^d	400.83±51.71 ^{d**}
5	693.54±103.72 ^e	586.42±79.11 ^{e**}
6	856.79±104.06 ^f	717.00±110.42 ^{f**}
7	1044.33±96.38 ^g	879.79±123.36 ^{g**}
8	1092.92±129.78 ^h	959.79±127.54 ^{h**}
9	1348.33±155.57 ⁱ	1123.13±157.49 ^{i**}
10	1247.33±153.79 ^j	1029.67±110.51 ^{j**}
11	1458.83±205.69 ^k	1264.88±152.53 ^{k**}
12	1779.88±273.90 ^l	1432.17±200.82 ^{l**}
13	2148.76±274.01 ^m	1597.71±156.12 ^{m**}
14	2308.04±279.52 ⁿ	1918.67±201.16 ^{n**}
15	2696.88±276.71 ^o	2106.38±184.01 ^{o**}

注: *表示同一周龄公鸡母鸡体重差异显著 ($P < 0.05$), **表示同一周龄公鸡母鸡体重差异极显著 ($P < 0.01$)。一系列数据上角标字母相同表示差异不显著, 字母不相同表示差异显著, 字母顺序 a~z 从小到大排列

表 4 logistic 生长曲线模型参数估计值

	模型参数			拟合度 (R^2)	拐点体重 (g)	拐点周龄 (w)
	A	B	K			
公鸡	4479.33	20.43	0.22	0.971	2238.17	13.71
母鸡	3151.92	15.96	0.22	0.97	1575.96	12.59

注: A: 成熟体重; K: 瞬时生长速度; B: 参数

法氏囊重显著大于母鸡 ($P < 0.05$); 12 周龄时公鸡肝脏重显著大于母鸡 ($P < 0.05$); 13 周龄时公鸡肝脏重, 脾脏重能显著大于母鸡 ($P < 0.05$), 法氏囊重显著大于母鸡 ($P < 0.01$)。15 周龄时公鸡心脏重显著大于母鸡 ($P < 0.01$), 公鸡肝脏重显著大于母鸡 ($P < 0.05$), 详见表 5。从这些差异可以分析出, 在生长发育期间, 公鸡和母鸡的器官差异主要体现在循环器官心脏和肝脏。免疫器官差异主要体现在法氏囊。3 周龄母鸡腺胃重显著大于公鸡 ($P < 0.01$); 10 周龄时母鸡腺胃重显著大于公鸡 ($P < 0.01$); 12 周龄时母鸡腺胃重显著大于公鸡 ($P < 0.05$); 公鸡胰腺和肠道显著长于母鸡 ($P < 0.01$); 15 周龄时公鸡腺胃重显著大于母鸡 ($P < 0.01$), 详见表 6。从这些差异

表5 不同周龄瑶鸡心脏肝脏脾脏法氏囊重变化表

项目	心脏重/g		肝脏重/g		脾脏重/g		法氏囊重/g	
	公	母	公	母	公	母	公	母
1W	0.66±0.08 ^a	0.80±0.19 ^a	3.24±0.43 ^a	4.14±0.84 ^a	0.08±0.00 ^a	0.14±0.09 ^a	0.14±0.10 ^a	0.17±0.10 ^a
2W	1.66±0.11 ^{ab}	1.56±0.17 ^a	7.38±1.38 ^{ab}	8.14±0.96 ^{ab}	0.68±0.33 ^a	0.78±0.16 ^a	1.08±0.08 ^{bc}	1.80±0.26 ^{b**}
3W	2.52±0.49 ^{abc}	1.62±0.21 ^{a*}	13.38±2.27 ^{bc}	11.38±0.58 ^{abc}	0.89±0.54 ^{ab}	1.04±0.11 ^{abc}	1.64±0.29 ^{bcd}	1.48±0.16 ^b
4W	3.58±0.58 ^{bc}	3.30±0.98 ^{bc}	16.46±1.73 ^{cd}	13.76±3.21 ^{abcd}	0.90±0.37 ^{ab}	0.78±0.19 ^a	1.64±0.42 ^{bcd}	1.58±0.46 ^b
5W	5.12±1.49 ^c	2.78±0.31 ^{b*}	23.06±5.46 ^{cd}	12.58±2.71 ^{abcd*}	1.56±0.32 ^{abc}	0.92±0.19 ^{ab*}	2.24±0.32 ^{cd}	1.60±0.41 ^{b*}
6W	4.24±0.91 ^c	3.20±0.47 ^{bc}	23.72±8.87 ^{cd}	17.20±3.92 ^{bcd}	1.70±0.33 ^{abc}	2.20±1.61 ^{abcd}	2.66±0.35 ^d	2.54±0.96 ^b
7W	4.20±0.62 ^c	3.76±0.31 ^{bc}	20.44±3.64 ^{cd}	22.58±9.73 ^{defg}	1.64±0.23 ^{abc}	2.26±1.41 ^{abcd}	2.06±0.56 ^{bcd}	2.62±0.57 ^b
8W	4.56±0.47 ^c	3.42±0.46 ^{bc*}	26.74±7.07 ^d	20.04±4.02 ^{def}	2.16±0.15 ^{abc}	2.04±0.86 ^{abcd}	2.54±0.43 ^d	1.62±0.57 ^b
9W	4.70±0.94 ^c	4.40±0.58 ^c	25.56±5.78 ^c	31.86±8.66 ^{gh}	2.32±0.68 ^{abc}	2.70±0.78 ^{abcd}	3.26±0.97 ^d	2.20±0.65 ^b
10W	4.78±1.21 ^d	3.86±0.40 ^{bc}	22.52±2.82 ^{cd}	28.34±5.99 ^{gh}	1.60±0.58 ^{abc}	3.54±1.65 ^{cd}	1.76±0.75 ^{bcd}	1.96±1.07 ^b
11W	4.50±0.56 ^c	3.72±0.36 ^{c*}	21.46±1.95 ^{cd}	22.94±2.16 ^{defg}	2.02±0.87 ^{abc}	2.70±0.94 ^{abcd}	2.72±0.85 ^d	1.54±0.59 ^{b*}
12W	7.58±0.91 ^d	5.46±1.26 ^d	39.80±3.93 ^e	26.04±4.55 ^{efgh**}	2.52±0.58 ^{abc}	1.82±0.58 ^{abcd}	1.68±0.55 ^{bcd}	2.28±0.99 ^b
13W	10.28±2.63 ^e	6.84±1.23 ^c	48.68±9.74 ^f	35.38±6.14 ^{h*}	4.14±1.65 ^c	3.48±1.26 ^{bcd*}	2.60±0.83 ^d	2.06±0.32 ^{b**}
14W	7.88±2.47 ^d	5.62±1.56 ^d	42.98±6.64 ^{ef}	33.66±11.22 ^{gh}	3.60±2.27 ^{bc}	3.90±2.19 ^d	1.78±0.76 ^{bcd}	2.46±1.17 ^b
15W	15.34±2.22 ^f	7.02±0.47 ^{c**}	64.72±9.04 ^g	44.78±8.66 ^{h*}	7.00±3.79 ^d	4.42±2.01 ^d	0.94±0.57 ^b	3.06±1.66 ^b

表6 不同周龄瑶鸡腺胃肌胃重胰腺肠道长变化

项目	腺胃重/g		肌胃重/g		胰腺长/cm		肠道长/cm	
	公	母	公	母	公	母	公	母
1w	0.96±0.21 ^a	1.02±0.08 ^a	4.08±0.56 ^a	4.38±0.37 ^a	6.58±0.64 ^a	6.20±0.84 ^a	65.84±8.66 ^a	69.20±8.63 ^a
2w	1.90±0.45 ^{ab}	1.84±0.30 ^{ab}	4.32±0.20 ^a	4.36±0.42 ^a	6.80±0.45 ^a	7.40±0.55 ^{ab}	79.00±4.90 ^{ab}	75.20±6.06 ^{ab}
3w	1.04±0.11 ^a	2.34±0.09 ^{abc**}	9.96±1.36 ^{ab}	9.28±1.21 ^{ab}	7.50±0.79 ^{ab}	7.40±0.54 ^{ab}	85.70±8.34 ^{ab}	85.40±9.73 ^{abc}
4w	3.46±0.98 ^{abc}	4.06±2.52 ^{bcd}	9.30±0.90 ^{ab}	9.74±0.91 ^{ab}	8.20±0.76 ^{abc}	7.80±0.90 ^b	85.00±8.75 ^{ab}	86.60±12.93 ^{abc}
5w	5.24±2.20 ^{cd}	3.26±0.50 ^{cd}	12.76±1.89 ^{bc}	10.86±3.77 ^b	9.20±0.67 ^{abc}	8.34±0.59 ^{bcd}	87.90±7.47 ^{ab}	82.50±6.63 ^{abc}
6w	4.02±1.19 ^{bc}	4.46±1.70 ^{bcd}	15.14±4.52 ^{bc}	13.36±1.79 ^b	8.76±0.70 ^{abc}	8.38±1.07 ^{bcd}	90.60±7.33 ^b	91.00±11.31 ^{bcd}
7w	5.62±4.23 ^{cd}	5.22±0.70 ^{bc}	18.74±3.14 ^{cd}	18.34±2.37 ^c	8.20±1.68 ^{abc}	8.20±1.04 ^{bcd}	99.40±19.20 ^{bc}	91.90±7.99 ^{bcd}
8w	5.18±0.81 ^{cd}	5.14±1.80 ^{bc}	22.94±2.98 ^{de}	20.44±3.96 ^c	9.10±1.08 ^{abc}	8.60±1.63 ^{bcd}	121.40±14.09 ^{cd}	101.40±13.87 ^{cd}
9w	5.06±1.34 ^{cd}	5.22±0.66 ^{bc}	28.72±6.35 ^{ef}	28.82±4.00 ^d	10.10±2.19 ^{bcd}	8.70±1.68 ^{bcd}	114.50±12.90 ^{cd}	101.70±10.95 ^{cd}
10w	3.86±0.48 ^{bc}	4.78±0.78 ^{bc**}	26.10±3.80 ^c	29.84±1.87 ^d	8.50±1.22 ^{abc}	9.50±1.00 ^{cd}	104.5±20.16 ^{bc}	101.90±12.90 ^{cd}
11w	5.06±1.32 ^{cd}	4.94±0.76 ^{bc}	29.24±3.34 ^{ef}	29.80±5.07 ^d	8.10±1.14 ^{abc}	8.40±1.67 ^{bcd}	97.30±8.14 ^{bc}	98.00±9.38 ^{cd}
12w	6.68±0.86 ^{cd}	7.52±1.63 ^{de*}	35.00±4.72 ^f	32.52±3.29 ^d	10.80±0.76 ^{cd}	7.90±0.74 ^{bc**}	121.24±12.72 ^{cd}	87.00±11.75 ^{abc**}
13w	7.52±1.63 ^{de}	6.84±1.04 ^f	38.40±7.01	38.72±4.56 ^d	11.80±2.68 ^d	7.40±0.54 ^{ab}	120.6±18.67 ^{cd}	93.60±9.15 ^{bcd}
14w	6.04±0.88 ^{cd}	6.84±1.04 ^f	27.32±5.19 ^c	29.88±5.17 ^d	9.90±0.89 ^{bcd}	9.60±1.14 ^d	99.6±6.19 ^{bc}	110.40±14.99 ^d
15w	9.26±1.59 ^e	6.46±0.69 ^{ef*}	35.22±4.84 ^f	32.36±4.64 ^d	11.30±1.96 ^d	10.40±1.78	131.70±16.73 ^d	129.00±10.20 ^e

注：*表示同一周龄公鸡母鸡同一器官之间差异显著(P<0.05)，**表示同一周龄公鸡母鸡同一器官之间差异极显著(P<0.01)；同一列表数据上角标字母相同的表示差异不显著，字母不相同的表示差异显著(P<0.05)，字母顺序 a-z 为均值由小到大排列

中可分析出，公鸡和母鸡在生长发育期间消化器官的差异主要存在于腺胃。

由表7可见，第3、8、5周龄的公鸡和母鸡心脏

指数呈现显著性差异(P<0.05)，其中第15周龄心脏指数差异极显著(P<0.01)；第5、10、11周龄的公鸡和母鸡肝脏指数呈现显著性差异(P<0.05)；第5、

10周龄的公鸡和母鸡脾脏指数呈现显著性差异($P<0.05$);第2、7、15周龄的公鸡和母鸡法氏囊指数呈现显著性差异($P<0.05$);第3、14周龄的公鸡和母鸡腺胃指数呈现显著性差异($P<0.05$),第10、13周龄的公鸡和母鸡腺胃指数呈现极显著性差异($P<0.01$);第13周龄的公鸡和母鸡肌胃指数呈现显著性差异($P<0.05$),第10、14、15周龄的鸡和母鸡肌

胃指数呈现极显著性差异($P<0.01$)。这表明,在0~10周龄期间,公鸡母鸡的器官指数差异主要体现在心脏、肝脏、脾脏和法氏囊;10~15周龄期间,公鸡母鸡的器官指数主要差异体现在腺胃和肌胃。

公鸡和母鸡的心脏、肌胃、腺胃、肝脏均在第1周的指数最大,随后逐渐减小。这表明瑶鸡首先发育心脏、肝脏、肌胃和腺胃。公鸡肝脏指数逐步

表7 公鸡母鸡器官指数对比表

周龄	心脏指数		肝脏指数		脾脏指数	
	公	母	公	母	公	母
1	11.11±1.38	12.05±2.82	54.87±7.34	62.37±12.59	1.35±0.00	2.02±1.37
2	11.54±0.79	10.38±1.11	51.32±9.59	54.16±6.41	4.73±2.27	5.19±1.09
3	8.82±1.74	6.19±0.78*	46.82±7.95	43.47±2.22	3.08±1.87	3.97±0.44
4	8.44±1.37	8.23±2.45	38.78±4.08	34.33±8.01	2.12±0.87	1.95±0.48
5	7.38±2.16	4.74±0.53	33.25±7.87	21.45±4.63*	2.25±0.46	1.57±0.33*
6	4.95±1.07	4.46±0.65	27.68±10.35	23.99±5.47	1.98±0.39	2.82±3.20
7	4.02±0.59	4.27±0.35	19.57±3.49	25.66±11.06	1.57±0.22	2.57±1.61
8	4.17±0.43	3.56±0.48*	24.47±6.47	20.88±4.19	1.98±0.14	2.13±0.90
9	3.49±0.70	3.92±0.52	18.96±4.29	28.37±7.71	1.72±0.50	2.40±0.69
10	3.83±0.98	3.75±0.39	18.06±2.26	27.52±5.81*	1.28±0.47	3.44±1.61*
11	3.08±0.38	2.94±0.28	14.71±1.34	18.14±1.70*	1.38±0.59	2.13±0.74
12	4.26±0.51	3.81±0.88	22.36±2.21	18.18±3.17	1.42±0.32	1.27±0.41
13	4.78±1.23	4.28±0.77	22.65±4.53	22.14±3.84	1.93±0.77	2.18±0.79
14	3.41±1.07	2.93±0.81	18.62±2.88	17.54±5.85	1.56±0.99	2.03±1.14
15	5.69±0.83	3.33±0.22**	24.00±3.35	21.26±4.11	2.60±1.41	2.10±0.96

周龄	法氏囊指数		腺胃指数		肌胃指数	
	公	母	公	母	公	母
1	2.40±1.77	2.56±1.47	16.26±3.51	15.37±1.26	69.09±9.53	65.98±5.58
2	7.51±0.58	11.98±1.70*	13.21±3.15	12.24±1.97	30.04±1.43	29.01±2.81
3	5.74±1.01	5.65±0.63	3.64±0.40	8.94±0.34*	34.85±4.74	35.45±4.61
4	3.86±0.98	3.94±1.14	8.15±2.31	8.28±1.79	21.91±2.13	24.30±2.26
5	3.23±0.46	2.73±0.70	7.56±3.17	6.92±4.29	18.40±2.72	18.52±6.43
6	3.10±0.41	3.54±1.34	4.69±1.39	4.55±0.70	17.67±5.28	18.63±2.49
7	1.97±0.54	2.98±0.44*	5.38±4.05	5.07±1.94	49.32±3.00	20.85±2.69
8	2.32±0.40	1.69±0.59	4.74±0.74	5.44±0.73	20.99±2.73	21.30±4.13
9	2.42±0.72	1.96±0.58	3.75±0.99	4.58±1.60	21.30±4.71	25.66±3.56
10	1.41±0.60	1.90±1.04	3.09±0.39	5.07±0.64**	20.93±3.05	28.98±1.82**
11	1.86±0.58	1.22±0.46	3.47±0.90	3.78±0.62	20.04±2.29	23.56±4.01
12	0.94±0.31	1.59±0.69	3.75±0.48	3.45±0.53	19.66±2.65	22.71±2.30
13	1.21±0.39	1.29±0.20	3.50±0.76	4.71±1.02**	17.87±3.26	24.23±2.86*
14	0.77±0.33	1.28±0.61	2.62±0.38	3.56±0.54*	11.84±2.25	15.57±2.70**
15	0.35±0.21	1.45±0.79*	3.43±0.59	3.07±0.33	11.84±2.25	15.57±2.70**

注:*表示同一周龄公鸡母鸡体重差异显著($P<0.05$),**表示同一周龄公鸡母鸡体重差异极显著($P<0.01$)

减小到第7周,达到稳定的趋势;母鸡肝脏指数逐步减小到第5周达到稳定的趋势。公鸡肌胃指数和母鸡指数趋势基本一致,1~2周大幅度下降,2~3周小幅度上升,之后又下降到第5周稳定。公鸡和母鸡心脏指数逐步减小到第6周达到稳定趋势,公鸡第14周指数明显增加;公鸡母鸡脾脏指数变化趋势基本一致,1~2周增加,之后逐步减小到第5周达到稳定趋势。公鸡母鸡法氏囊指数变化趋势基本一致,1~2周增加,之后逐步减小到第5周达到稳定趋势。公鸡母鸡腺胃指数变化趋势基本一致,都减小到第6周达到稳定趋势,但是公鸡在第3周有明显增加的趋势。

3 讨论

3.1 0~15周龄瑶鸡的体重生长发育情况分析

张绍胜等人利用logistic拟合曲线分析文昌鸡、清远麻鸡与崇仁麻鸡生长发育规律,曲线拟合度都在0.99以上,效果较好^[8]。本试验采用logistic拟合曲线分析瑶鸡体重生长规律,拟合度0.97左右,原因可能是试验操作中的非系统误差。由logistic拟合曲线参考值K来说,公鸡K值大于母鸡,说明公鸡生长潜力大于母鸡,这也与实际测量鸡的体重情况吻合。公鸡的13.71周龄和母鸡的12.59周龄是瑶鸡的生长拐点,拐点体重分别为2238.17 g和1575.96 g。唐燕飞等研究瑶鸡的生长拐点周龄在10周龄,拐点体重是1035.62 g^[9]。本试验研究结果与前人研究结果不一致,可能因为瑶鸡的饲养管理规程不同导致生长曲线的各种参数不同,也可能是由于本试验研究的瑶鸡经过选育后生长性能不同而导致。

公鸡和母鸡在发育同一周龄,体重差异明显,其中第2周龄差异显著($P<0.05$),其余周龄差异极显著($P<0.01$),详见表3。第1、2周龄时母鸡体重明显大于公鸡,第2周开始,公鸡体重增速更快,并实现反超。第3~15周龄,公鸡体重明显大于母鸡。余春林的研究结果也体现了这个规律,即公鸡体重大于母鸡^[10]。另外,公鸡、母鸡的体重随周龄的增加而不断增加,并且每周龄之间呈现差异显著($P<0.05$)。这表明瑶鸡正常生长,并未出现导致体重大幅降低的疾病。公鸡和母鸡在第10周龄时体重下降,可能与当周抽取鸡存在误差有关。

3.2 0~15周龄瑶鸡主要器官指数及发育规律比较

试验动物的器官指数不仅有助于研究瑶鸡的正常生长发育规律,而且也可以指示鸡群是否处于亚健康状态。测定瑶鸡脏器重量和活体体重,比值即为器官指数,用此指标来探究周龄和性别是否是影响器官指数变化的主要因素。

公鸡和母鸡的器官重量随周龄增加而增加,但并不是一直呈现增加的趋势,随周龄增加,某些器官重量反而减小。其一可能由于鸡器官发展水平差异很大,抽鸡有误差;其二可能因为每周抓取五只公鸡,数量太少导致误差较大,因此应该按照严格要求进行试验,同时增加每周解剖鸡的数量,从而达到减小误差的目的。各器官在生长发育期间,每个器官只有个别周龄之间的器官重量呈现显著性差异,大部分周龄之间的器官重量不存在显著性差异。通过对瑶鸡不同周龄之间公鸡和母鸡器官重量进行对比后发现,在生长发育期间,公鸡和母鸡的器官差异主要体现在循环器官心脏和肝脏。免疫器官差异主要体现在法氏囊,公鸡和母鸡在生长发育期间消化器官的差异主要存在于腺胃,如表5和表6所示。这与于萍的研究结果基本一致^[11]。瑶鸡在生长发育期间,心脏重、肝脏重、腺胃重和法氏囊重与性别的相关性较大,而脾脏重、肌胃重、胰腺长和肠道长与性别关系不明显。

器官指数可以减小各周龄鸡体重差异性的影响,可以更好的反应瑶鸡内脏器官的发育情况。杜卫国等人的研究结果可知,动物脏器的质量和指数与其功能呈现正相关,由本研究的器官指数大小和变化趋势可以分析该器官对于某一周龄瑶鸡的重要程度^[12]。试验的公鸡、母鸡器官指数共同显示,在生长发育期间,肝脏指数>肌胃指数>腺胃指数>心脏指数>法氏囊指数>脾脏指数,消化指数在前四周最大,说明这个生长时期,消化器官的功能最强大,同时表示肝脏和肌胃成熟较快,这与宁康健对青脚麻鸡内脏器官生长发育的研究结果基本一致^[13]。消化器官指数随周龄增加而降低,这表明瑶鸡在生长前期就完善消化系统,有利于营养物质的快速吸收,为增长体重奠定基础,也可帮助完善免疫系统,可能与肠道微生物参与免疫有关^[14]。对同一周龄瑶鸡公鸡和母鸡器官指数进行对比后,分析出在0~10周龄期间,公鸡母鸡的

器官指数差异主要体现在心脏、肝脏、脾脏和法氏囊;10~15周龄期间,公鸡母鸡的器官指数主要差异体现在腺胃和肌胃,见表7。

法氏囊是鸟类动物特有的中枢免疫器官,其发育情况对瑶鸡健康成长有着重要的作用,研究的结果显示公母鸡法氏囊指数变化趋势基本一致,1~2周增加,之后逐步减小到第5周达到稳定趋势。这说明,法氏囊对公鸡和母鸡一样重要,在前两周的作用较大,帮助雏鸡安全度过育雏期,之后随着周龄增加达到稳定趋势,这说明法氏囊发育速度基本与体重发育速度一样。法氏囊对整个试验期间的瑶鸡都很重要,但是清楚可见的是在10周龄之后,法氏囊指数逐渐下降,可能与法氏囊退化有关。脾脏的发育迟于其他内脏器官的发育,这与黎观红等对泰和鸡的研究结果一致^[15]。脾脏指数在第二周呈现上升趋势,说明此时脾脏生长发育速度大于体重增长速度,可能是与前两周多次注射疫苗有关。就免疫器官指数趋势而言,公鸡和母鸡某些周龄存在差异。另外免疫器官重量减小可能与成熟细胞释放血液或外周淋巴器官有关^[16]。除了肝脏外,公母鸡其他内脏器官生长趋势基本一致,表明性别不是影响器官发育的主要因素,因为随着周龄增加,器官指数变化明显,因此周龄是影响器官发育的主要因素。

4 结论

本试验结果显示,广西瑶鸡公鸡和母鸡生长发育的拐点周龄分别为13.71周龄和12.59周龄,拐点体重分别为2238.17 g和1575.96 g。提示要保证前13周的饲料营养配比全价和平衡。公母鸡的器官指数变化规律一致,心脏、肌胃、腺胃、肝脏均在第一周的指数最大,随后逐渐减小,提示广西瑶鸡优先发育心脏、肝脏、胃等重要代谢及消化器官。本研究结果初步揭示了广西瑶鸡的生长发育

规律,为广西瑶鸡的育种工作提供科学的理论依据。

参考文献:

- [1] 李毅, 黄华敢, 张增亮, 等. 几个广西地方鸡种品系羽色、胫色遗传规律的研究[J]. 广西畜牧兽医, 2017, 33(1):3-5.
- [2] 万火福, 孙俊丽, 黄英飞, 等. 广西三黄鸡生长曲线拟合与分析[J]. 广西畜牧兽医, 2021, 37(3):99-102.
- [3] 翁茁先, 黄勋和, 李威娜, 等. 五华三黄鸡生长曲线拟合及最佳上市时间分析[J]. 经济动物学报, 2018, 22(3):181-186.
- [4] 刘聪, 华国洪, 李华, 等. 麻鸡三品系胫生长曲线分析[J]. 中国家禽, 2016, 38(19):52-55.
- [5] 邹剑敏, 宋迟, 单艳菊, 等. 清远麻鸡体重和胫生长曲线的拟合[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4):213-215.
- [6] 姬杰菲, 陈青, 臧卉, 等. 固始鸡与矮脚鸡/瑶鸡的杂交对后代鸡冠发育及性成熟的影响[J]. 河南农业大学学报, 2020, 54(1):64-68.
- [7] 周永蔚, 蔡涛, 邹慧娟, 等. 雄性文昌鸡雏鸡体重、内脏器官生长发育及心率变化规律的研究[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(5):39-43.
- [8] 张绍胜, 程仁荣, 耿照玉, 等. 文昌鸡、清远麻鸡与崇仁麻鸡生长发育规律研究[J]. 农技服务, 2007, 24(1):69-70.
- [9] 唐燕飞, 巨晓军, 章明, 等. 瑶鸡生长发育规律、屠宰性能及肉质评价的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(6):39-44.
- [10] 余春林, 蒋小松, 杜华锐, 等. 沐川乌骨黑鸡生长曲线拟合与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2018(5):195-198, 248.
- [11] 于萍. CZ-SPF鸡解剖、生理和生化数据的采集与分析[D]. 硕士学位论文. 黑龙江:哈尔滨师范大学, 2016.
- [12] 杜卫国, 鲍毅新, 施利强, 等. 社鼠内脏器官重量和水分含量的季节变化[J]. 动物学杂志, 1999(1):23-25.
- [13] 宁康健, 高树生, 吕锦芳, 姜锦鹏. 青脚麻鸡生长期内脏器官生长规律[J]. 当代畜牧, 2010(11):6-8.
- [14] 韩进诚, 瞿红侠, 王建国, 等. 肉鸡肌肉、内脏和消化器官的生长规律[J]. 饲料工业, 2014, 35(10):27-29.
- [15] 黎观红, 瞿明仁, 晏向华, 等. 泰和鸡早期(0~12周龄)内脏器官生长发育规律的研究[J]. 经济动物学报, 2005, 9(1):35-38.
- [16] 李奎, 褚雪吟, 康相涛, 等. 固始鸡免疫器官指数的发育规律研究[J]. 动物医学进展, 2009, 30(11):54-57.

正交法比较两种新会柑果肉中总黄酮提取工艺

容庭¹, 马新燕¹, 李贞明², 刘志昌¹, 崔艺燕¹, 邓盾¹, 马现永¹, 宋敏¹,
田志梅¹, 杜宗亮², 余苗^{1*}

(1. 广东省农业科学院动物科学研究所; 畜禽育种国家重点实验室; 农业农村部华南动物营养与饲料重点实验室; 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室; 广东畜禽肉品质量安全控制与评定工程技术研究中心, 广东 广州 510640;

2. 清远市龙发种猪有限公司, 广东 清远 511500)

摘要:为优化新会柑果肉总黄酮的提取工艺, 采用超声波提取法和微波法比较其总黄酮的最佳提取工艺条件, 试验结果表明, 超声波提取法最佳工艺条件为: 提取功率75W, 提取时间45 min, 提取溶剂70%; 微波法最佳工艺条件为: 微波功率400 W, 提取时间6 min, 料液比1:30; 微波法优于超声波提取法, 总黄酮的提取率分别为(8.30±0.05)%和(6.31±0.05)%。

关键词: 新会柑果肉; 总黄酮; 正交实验; 超声波提取法; 微波法; 提取工艺
中图分类号: S816.7 文献标识码: B 文章编号: 1005-8567(2022)05-0013-05

Comparison of Two Common Extraction Technology of Total Flavonoids from Xinhui Tangerine Pulp by Orthogonal Method

RONG Ting¹, MA Xinyan¹, LI Zheng ming^{1,2}, LIU Zhichang¹, CUI Yiyang¹, DENG Dun¹,

MA Xianyong¹, CHONG Ming¹, TIAN Zhimei¹, DU Zhongliang^{1,2}, YU Miao^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding; Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition; guandong engineering technology research center of animalo meat quality and safety control and evaluation, Guangzhou Guangdong 510640;

2. Qingyuan Longfa Pig Breeding Co., Ltd., Qingyuan Guangdong 511500)

Abstract: In order to optimize the extraction process of total flavonoids from Xinhui orange pulp, ultrasonic extraction method and microwave method were used to compare the optimal extraction process conditions of total flavonoids. The results showed that the optimal process conditions of ultrasonic extraction method were extraction power 75 W, extraction time 45 min and the extraction solvent is 70%. The optimum process conditions of microwave method were microwave power 400 W, extraction time 6 min and solid-liquid ratio 1:30. The microwave method is better than ultrasonic extraction method, the extraction rate of total flavonoids was (8.30±0.05)% and (6.31±0.05)%, respectively.

Keywords: Xinhui Orange Pulp; Flavonoid; Orthogonal Experiment; Ultrasonic Extraction; Microwave Method; Extraction Process

收稿日期: 2022-04-08

基金项目: 清远市科技计划项目(2020KJJH020; 2020DZX024); 英德市科技计划项目(JHXM2019040); 2022年广东省农业科研类及技术推广示范类项目

作者简介: 容庭(1983-), 男, 硕士, 高级畜牧师, 主要从事生态养殖与环境控制研究。E-mail: 155320782@qq.com

*通讯作者: 余苗(1985-), 女, 博士, 从事生态养殖与环境控制研究。E-mail: 3942408091@qq.com

新会陈皮是产于江门的道地药材,其来源于新会柑(新会广陈柑或陈皮柑)的干燥果皮,药食同源,具有极高经济价值,是地理标志保护产品。据统计,2020年新会柑种植面积超10万亩(6666.7公顷),鲜果产量约20万吨,而生产陈皮的副产品主要为柑果肉,其产生量也是巨大,因多年缺乏资金技术投入柑果肉的资源化利用,造成资源浪费与生态环境破坏。如能高值化利用,将产生巨大的经济、社会和生态效益。

新会柑果肉含有多种生物活性物质,如黄酮类、有机酸、多糖等化学活性成份,具有重要的生理活性及保健功能。目前,新会柑果肉中黄酮类化合物提取工艺研究未见有相关文献报道。因此,本试验拟采用超声波提取法和微波法探讨新会柑果肉中总黄酮最适合的提取工艺条件,寻找一种更为合理方便、快捷高效的工艺途径,为新会柑果肉综合利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新会柑果肉采自广东江门新会,经挑选、清洗,搅碎,备用;芦丁标准品(纯度 $\geq 98\%$),购于合肥博美生物科技有限责任公司;乙醇(纯度 $\geq 99.7\%$),购于广州化学试剂厂。电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9140A型)、高速中药粉碎机(DF-20型)、数控超声波清洗器(KQ3200DE型)、循环水式真空泵(SHZ-0(Ⅲ)型)、可见分光光度计(UV-1750型)、电子天平(AB-135S型)、电子天平(AL207型)、旋转蒸发器(RE-52A型)、WD800G型微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准曲线的制作

以芦丁标准品为标准物,采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色法,芦丁标准品在510 nm波长处有最大吸收值,故选用此波长作为新会柑果肉中总黄酮的含量测定波长;以芦丁样品浓度(C)—吸光值(A)作图,得出标准曲线线性回归方程: $A=11.404C-0.0633(R^2=0.9978)$,A为吸光度,C为芦丁浓度(mg/mL)^[1-2]。

1.2.2 陈皮柑果肉中总黄酮的提取与测定

1.2.2.1 超声波提取法

将新鲜的柑果肉粉碎,用100~120目过筛,经冷冻真空干燥机干燥粉碎,获得粉泥(水分含量:12%)备用。称取5 g粉泥9份,分别置于250 mL圆底烧瓶,加入不同体积和浓度的乙醇,在不同超声功率、温度下超声提取一定时间。提取1次后,先常压蒸馏,大约蒸出1/3溶剂;再减压蒸馏至近干,即获得提取物^[14]。提取物移置25 mL容量瓶中,用一定体积分数提取溶剂(乙醇)定容,摇匀,放置15 min,参照 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 显色法,在510 nm处测定其吸光值,并根据标准曲线线性回归方程计算总黄酮量,计算提取率。计算公式如下:

$$\text{总黄酮提取率}(\%) = \frac{\text{总黄酮质量}}{\text{柑果肉质量}} \times 100$$

1.2.2.2 微波法^[3-5]

称取5 g粉泥9份,分别置于250 mL圆底烧瓶,加入一定量的蒸馏水浸泡2 h,移置微波炉,在不同功率、温度下提取一定时间。提取3次后,过滤合并滤液;抽滤干燥得黄酮粗物。测定方法参照1.2.2.1。

1.2.3 柑果肉中总黄酮提取单因素试验

选取乙醇体积分数(两种提取均选用浓度:40%、50%、60%、70%、80%、90%),料液比(超声波提取:1:3、1:5、1:7、1:9、1:12、1:15;微波提取:1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35),提取时间(超声波提取:15、30、45、60、75、90 min;微波提取:1、3、6、9、12、15 min)和提取功率(超声波提取:30 W、45 W、60 W、75 W、90 W、120 W;微波提取:200 W、300 W、400 W、500 W、600 W、700 W)4个单因素进行试验。

1.2.3 正交实验

在单因素实验的基础上,超声波提取法提取总黄酮提取率影响较大的三个因素:超声功率、提取时间、提取溶剂;微波提取法三个因素:微波功率,提取时间,料液比;两种提取法每个因素取三水平设计因素水平表,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验进行,因素水平表见表1至表2。

1.2.4 数据处理

利用SPSS 20.0软件中正交实验进行处理与显著性分析;数值以平均值 \pm 标准差表示。

表1 正交实验因素水平表

因素	水平		
	1	2	3
A(超声功率, W)	60	75	90
B(提取时间, min)	30	45	60
C(提取溶剂, %)	50	60	70
D(空白)	0	0	0

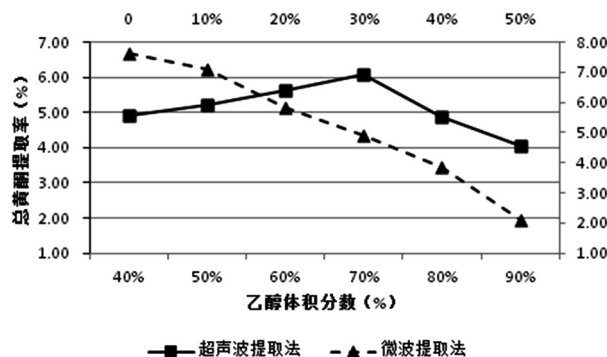
表2 正交实验因素水平表

因素	水平		
	1	2	3
A(微波功率, W)	400	500	600
B(提取时间, min)	3	6	9
C(料液比, %)	1:10	1:20	1:30
D(空白)	0	0	0

2 结果与分析

2.1 乙醇体积分数对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

由图1可知,在固定超声功率90 W、提取温度60 ℃和提取时间30 min的条件下,当乙醇体积分数为70%时,超声波提取总黄酮的提取率最高,但乙醇体积分数大于70%,提取率随着乙醇体积分数增加逐渐下降;在固定微波功率400 W、料液比1:20、提取时间6 min的条件下,微波法提取的总黄酮提取率随乙醇体积分数增加再快速下降。因此,超声波提取法选择乙醇体积分数为60%~70%为宜,70%最佳;微波提取法选择0~10%为宜,0%最佳。



注:超声波提取法以主纵坐标轴和主横坐标表示,微波提取法以次坐标轴和次横坐标表示。下同。

图1 乙醇体积分数对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

2.2 料液比对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

由图2可知,在固定超声功率90 W、乙醇体积分数60%、提取时间30 min的条件下,当料液比为1:9时,超声波提取总黄酮的提取率最高,但料液比大于1:9,提取率明显下降;在固定微波功率500 W、蒸馏水浸泡时间2 h,提取时间9 min的条件下,料液比为1:10~1:30区间,微波提取的总黄酮提取率随料液比增加快速增加。因此,超声波提取法选择料液比为1:9;微波提取法选择1:30为宜。

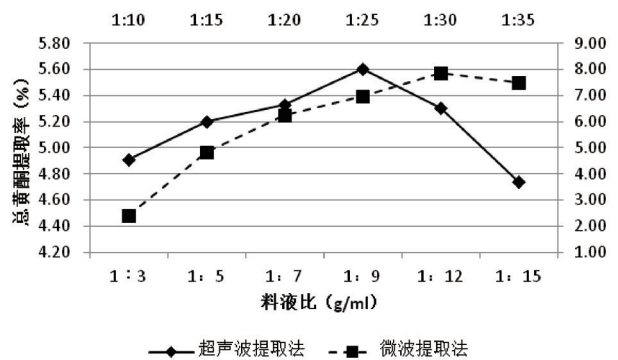


图2 料液比对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

2.3 提取时间对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

由图3可知,在固定超声功率90 W,乙醇体积分数60%、料液比为1:9的条件下,提取时间为45 min时,超声波提取总黄酮的提取率最高,但当提取时间大于60 min,提取率缓慢下降;在料液比为1:30、蒸馏水浸泡时间2 h,微波功率500 W的条件下,当提取时间为6 min,微波提取总黄酮的提取率最大,但随着提取时间增加,提取率快速下降。

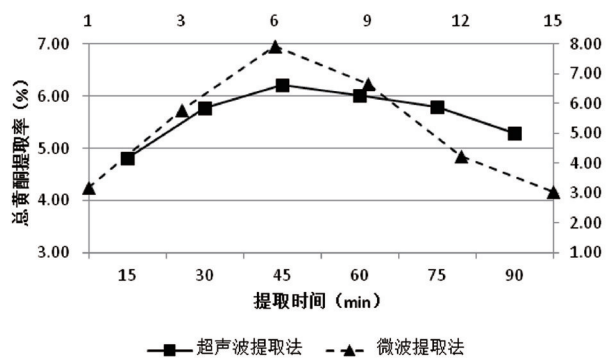


图3 提取时间对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

因此,超声波提取法选择提取时间为45 min;微波提取法选择6 min为宜。

2.4 提取功率对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

由图4可知,在乙醇体积分数60%、提取温度为60℃,提取时间30 min的条件下,当超声功率为75 W时,超声波提取总黄酮的提取率最高,但当超声功率大于75 W,提取率明显下降;在料液比为1:30、蒸馏水浸泡时间2 h,提取时间9 min的条件下,当微波功率为400 W时,总黄酮提取率最大,随着微波功率增大,提取率快速下降。因此,超声波提取法选择功率为75 W;微波提取法选择400 W为宜。

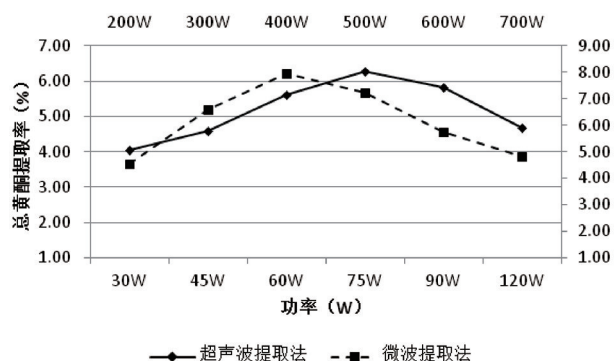


图4 提取功率对新会柑果肉中总黄酮提取率的影响

2.5 正交实验结果

2.5.1 超声波提取法对柑果肉中总黄酮提取率的影响

由表3至表4可以,以新会柑果肉中黄酮的提取率为考察指标,对提取工艺进行优选。表中提取溶剂对黄酮的提取影响较大,提取功率次之。从方差分析结果看提取溶剂有较大的显著性差异,数据显示最佳提取工艺条件:提取功率75 W,提取时间45 min,提取溶剂70%。各因素对黄酮提取效果的影响主次依次为提取溶剂 > 提取功率 > 提取时间。

2.5.2 微波提取法对柑果肉中总黄酮提取率的影响

以新会柑果肉中黄酮的提取率为考察指标,对提取工艺进行优选。由表5至表6可知,料液比对黄酮的提取影响较大,提取时间次之。从方差分析结果看料液比和提取时间显示极大显著性差异,数据显示最佳提取工艺条件:微波功率400

W,提取时间6 min,料液比1:30。各因素对黄酮提取效果的影响主次依次为料液比 > 提取时间 > 微波功率。

表3 超声波提取法正交实验结果

组别	A(超声功率, W)	B(提取时间, min)	C(提取溶剂, %)	空白	提取率 (%)
1	90	45	70	0	6.14
2	90	60	50	0	5.05
3	75	30	70	0	6.26
4	75	60	60	0	6.02
5	75	45	50	0	5.87
6	60	60	70	0	5.44
7	60	30	50	0	4.74
8	90	30	60	0	5.68
9	60	45	60	0	5.93

表4 方差分析表

项目	平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	2.08	6	0.347	33.506	0.029
A	0.709	2	0.354	34.251	0.028
B	0.407	2	0.203	19.664	0.048
C	0.961	2	0.482	46.603	0.021

注:0.01 < P ≤ 0.05 表示差异显著, P ≤ 0.01 表示差异极显著

表5 微波提取法正交实验结果

组别	A(微波功率, W)	B(提取时间, min)	C(料液比)	空白	提取率 (%)
1	600	9	1:10	0	2.33
2	400	6	1:30	0	8.22
3	600	3	1:30	0	5.39
4	500	3	1:20	0	3.42
5	500	9	1:30	0	6.68
6	400	3	1:10	0	1.81
7	400	9	1:20	0	6.05
8	500	6	1:10	0	2.61
9	600	6	1:20	0	5.95

表6 方差分析表

项目	平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	40.102	6	6.684	317.099	0.003
A	2.01	2	1.005	47.672	0.021
B	6.735	2	3.368	159.772	0.006
C	31.357	2	15.679	743.852	0.001

注:0.01 < P ≤ 0.05 表示差异显著, P ≤ 0.01 表示差异极显著

2.6 条件优化、预测与验证

超声波提取法最佳提取工艺条件为:提取功率75 W,提取时间45 min,提取溶剂70%;微波提取法最佳提取工艺条件为:微波功率400 W,提取时间6 min,料液比1:30。分别在最佳条件下进行5次平行实验,试验结果见下表7。由此可知,检测结果与正交结果较相近,得到最佳优化工艺参数、稳定可靠。

表7 验证实验结果

组别	1	2	3	4	5	平均
超声提取率/%	6.32	6.25	6.38	6.3	6.28	6.31±0.05
微波提取率/%	8.36	8.33	8.24	8.3	8.28	8.30±0.05

注:结果以“平均数±标准差”表示

3 讨论

植物总黄酮类化合物的提取方法众多,按技术类型分单一提取法、辅助提取法和多种方法的耦合提取,按时间类型分传统提取法和现代提取法^[6]。传统提取方法有煎煮法、回流提取法、索氏提取法、浸渍法、渗漉法、水蒸汽蒸馏法等^[1]。现代提取法有超临界流体萃取法、微波提取法、超声提取法、酶解法等。传统提取法存在耗时、耗料、提取率低、有效成分易破坏等诸多缺点;现代提取法虽具有诸多优点,如缩短提取时间、节约溶剂,提高提取率,但需要配备先进的设备和技术。李巧凤等(2020)试验显示,采用纤维素酶联合微波提取石崖茶中黄酮类化合物,较单一提取法,得率分别提高了66.87%和18.12%^[7]。Xu等采用酶法辅助超声-微波协同提取果皮中黄酮类化合物,较单一提取的得率分别提高了26.5%、22.31%和12.98%^[8]。吴淑清等试验发现,以乙醇溶液作为溶剂,采用酶解法协同超声波提取当归叶中的总黄酮,提取率达到最大值,为12.6 mg/g^[9]。Meng等采用低共溶剂溶剂协同超声辅助提取蒲黄中的黄酮类化合物,较单一提取获得更高的提取率^[10]。黄文睿等研究合成4种性能优异的低共熔溶剂(DES),以氯化胆碱/尿素DES为溶剂,提取野菊花中的总黄酮、总槲皮素和槲皮苷,提取效果最好^[11]。本试验采用单一提取技术,未能充分发挥提取效果,鉴于此,利用耦合提取技术挖掘新会柑

果肉的有效成分,获得最大的提取率,值得深入研究。

超声波提取法和微波提取法在植物黄酮类化合物提取方法中应用较为广泛^[1-2, 12-14]。本试验采用正交方法,评估超声波提取法和微波法提取新会柑果肉中的总黄酮,得出微波提取的得率最高,其工艺条件稳定、可行。本试验采用微波提取法,选定的因素为微波功率、提取时间及料液比,未采用有机溶剂乙醇,这与前人报道结果不一致,其原因可能是提取物料种类和性质不同造成选用的因素条件也不同^[7, 12-13, 15]。随着提取技术的快速发展,植物黄酮类化合物的提取技术研究趋于精细化和多种方法的耦合提取。因此,深入开展新会柑果肉中有效成分的耦合提取技术是十分必要的,同时也为新会柑果肉的资源化利用方面提供有价值的参考依据。

4 结论

本研究发现了提取新会柑果肉中总黄酮的两种方法:超声提取法和微波提取法。超声波提取法最佳提取工艺条件为:提取功率75 W,提取时间45 min,提取溶剂70%;微波提取法最佳提取工艺条件为:微波功率400 W,提取时间6 min,料液比1:30;微波提取优于超声波提取,提取工艺稳定、可靠。

参考文献:

- [1] 宋浩铭,容庭,刘志昌,等.响应曲面法优化芒果叶总黄酮的超声提取工艺[J].广东农业科学,2016,2:116-112.
- [2] 张静,陶俊洪,刘银,等.响应曲面法优化超声辅助提取芒果叶中多酚和黄酮工艺及抗氧化活性研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2020,29(6):527-534.
- [3] YOU-HUA C, JIN Q, JING H, et al. Structural characterization and identification of major constituents in Radix Scrophulariae by HPLC coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2014, 12(1): 47-54.
- [4] LIU H, ZHENG Y, LI C, et al. Discovery of Anti-inflammatory Ingredients in Chinese Herbal Formula Kouyanqing Granule based on Relevance Analysis between Chemical Characters and Biological Effects[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 18080.
- [5] 正交法比较三种常见的槐米总黄酮提取工艺[J].广州化工,2019,9(47):108-123.
- [6] 景联鹏,唐徐禹,顾丽莉,等.植物中黄酮类化合物提取技术

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.04

水提工艺对裸花紫珠主要有效成分的影响

曾富兰¹, 傅嘉莉², 张献英¹, 朱琼¹, 吉艺宽¹, 陈秋凤², 程怀灵³, 李美娣^{1*}

(1. 广东梅州职业技术学院, 广东 梅州 514011;

2. 广东华农高科生物药业有限公司, 广东 广州 510642;

3. 广州格雷特生物科技有限公司, 广东 广州 510643)

摘要: 本文主要进行水提工艺对裸花紫珠主要有效成分的影响研究, 在考察料液比、煎煮次数对木犀草苷和毛蕊花糖苷含量影响的基础上, 设计正交试验, 研究裸花紫珠最佳水提工艺。试验结果表明, 料液比对木犀草苷和毛蕊花糖苷含量无显著影响($P>0.05$); 煎煮次数对木犀草苷和毛蕊花糖苷含量的影响显著($P<0.05$), 其中煎煮次数为3次时提取液中毛蕊花糖苷和木犀草苷的含量最高。正交试验结果表明, 提取次数对毛蕊花糖苷和木犀草苷含量的影响最大, 其次是提取时间, 料液比对其的影响最小, 最佳水提工艺为14倍水提取3次, 每次1小时。

关键词: 裸花紫珠; 水提工艺; 毛蕊花糖苷; 木犀草苷

中图分类号: S853.7 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)05-0018-05

Study on the effects of water extraction technology on the main effective components of *Callicarpa nudiflora*

ZENG Fulan¹, FU Jiali², ZHANG Xianying¹, ZHU Qiong¹, JI Yikuan¹, CHEN Qiufeng²,
CHENG Huailing³, LI Meidi^{1*}

(1. Guangdong Meizhou Vocational and Technical College, Meizhou Chinese Veterinary Drug Engineering Technology Research Center, Meizhou Guangdong 514011;

2. Guangdong Huanong Hi-Tech Biopharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou Guangdong 510642;

3. Guangzhou Great Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou Guangdong 510643)

Abstract: This study aimed to investigate the effect of water extraction process on the main active components of *Callicarpa nudiflora*. An orthogonal experiment was designed to study optimal water extraction technology of *Callicarpa nudiflora* based on the investigating the solid-liquid ratio and the number of decoction times on the contents of luteolin and verbascoside. The results showed that there was no significant difference in the effect of solid-liquid ratio on the contents of luteolin and verbascoside ($P>0.05$), but the content of luteolin and verbascoside was the best when the water addition ratio was 14 times. There was a significant difference in the effect of the number of decoction times ($P<0.05$), and the contents of verbascoside and luteolin in the extract was the highest when the number of decoctions was 3 times. The orthogonal test results showed that the extraction times had the greatest influence on the contents of mullein and luteolin, followed by the extraction time, the ratio of solid to liquid had the least influence, and the optimal water extraction process was 14 times of water for 3 times, and 1 hour each.

Keywords: *Callicarpa nudiflora*; Water extraction process; Acylate; Mignonette glycosides

收稿日期: 2022-04-15

基金项目: 2021年度梅州市应用型科技专项资金项目(2021B0204003)

作者简介: 曾富兰(1987-), 女, 农学硕士, 研究方向为药用植物。E-mail: zengfulanha@163.com

*通讯作者: 李美娣(1981-), 女, 高级兽医师, 兽医博士, 研究方向为新兽药研究推广。E-mail: limeidi@163.com

近年来,有机农产品、无抗养殖是我国的民生热点,中草药因药物残留少、增强免疫及促进动物生长等优势成为替代抗生素的主要产品,是开发新兽药的主要方向。裸花紫珠(*Callicarpa nudiflora* Hook.et Am.)是马鞭草科紫珠属植物,是海南道地药材、传统黎药,具有消炎、止血、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、促进伤口愈合及保肝等作用^[1-6]。其主要成分包括黄酮类、挥发油、萜类、酚类及鞣质等,其中含量较高的活性成分为毛蕊花糖苷和木犀草苷,具有缩短出血时间和凝血活酶时间的作用,是裸花紫珠具有止血功能的主要成分^[7]。

裸花紫珠作为单味植物药,临床主要用于治疗烧伤、烫伤和术后出血,尤其是妇科出血和炎症,研究发现裸花紫珠还能治疗牙龈炎、口腔溃疡及咽喉炎,现有主要剂型有片剂、胶囊剂、散剂、栓剂和膏等剂型^[8-14]。目前,裸花紫珠在畜牧兽医方面的应用较少,目前应用于兽医方面的剂型仅有散剂,研究发现,裸花紫珠提取液对体外鸡源大肠杆菌具有显著的抑制作用,饲料中添加裸花紫珠促进猪生长^[15-16]。本文主要研究裸花紫珠水提工艺及其对主要有效成分的影响,为今后深入研究兽用药剂型奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

裸花紫珠对照药材(供薄层鉴别用,批号121582-201402,)、毛蕊花糖苷对照品(批号111530-201411,含量以94.4%计)、木犀草苷对照品(批号111720-201408,含量以94.9%计),均购于中国食品药品检定研究院,由广东华农高科生物药业有限公司馈赠;裸花紫珠药材,为广州格雷特生物科技有限公司馈赠。

1.2 仪 器 与 试 剂

高效液相色谱仪(日本岛津LC-15C,紫外检测器,LC-20AT泵,SIL-20A自动进样器,LC Solution色谱工作站);WFH-203B型三用紫外分析仪(上海精科实业有限公司);HWS-24型电热恒温水浴锅;AUW-120D型十万分之一电子天平(日本岛津);薄层色谱展开缸;硅胶G薄层板购于青岛海洋化工有限公司;电热鼓风干燥箱(DHG-9123A型,上海申贤恒温设备厂);超声波清洗器(KH5200DE,昆山

禾创超声仪器有限公司)、烧杯、容量瓶等。甲醇、乙腈均为色谱纯,蒸馏水(屈臣氏),乙醇、氯仿等试剂为分析纯。

2 方 法

2.1 料液比试验

称取四份100 g裸花紫珠药材,剪碎放入锅中,分别加入10倍、12倍、14倍及16倍水,煎煮3次,每次煮1小时;合并提取液浓缩至150 mL左右,放凉定容至250 mL,4000 r/min离心15 min取上清液装瓶保存。每个水平重复三次。

2.2 煎煮次数试验

称取三份100 g裸花紫珠药材,剪碎放入锅中,分别加入14倍水,分别煎煮的次数为3次、2次和1次,每次煮1小时;合并提取液浓缩至150 mL左右,放凉定容至250 mL,4000 r/min离心15 min取上清液装瓶保存。每个水平重复三次。

2.3 正交试验

在料液比及煎煮次数试验基础上,结合工业生产情况确定提取时间、提取次数和料液比为研究因素,以毛蕊花糖苷、木犀草苷提取量为指标,按 $L_9(3^3)$ 正交试验表进行水提工艺试验。

参照刘晓等测定裸花紫珠总黄酮含量的方法^[5],分别称取裸花紫珠药材100 g,置于锅中,加水煎煮提取,合并提取液浓缩、定容、离心,适当稀释后测定毛蕊花糖苷、木犀草苷含量。每个水平重复三次。正交试验因素水平表见表1。

表1 裸花紫珠水提取水平因素表

水平	因素		
	A加水量(倍)	B提取次数(次)	C提取时间(h)
1	10	1	0.5
2	12	2	1
3	14	3	1.5

2.4 薄层色谱鉴别方法

取裸花紫珠提取液1 mL,加水150 mL,煎煮,保持微沸1小时,放冷,滤过。取滤液加氯化钠5 g,振摇使溶解,用乙酸乙酯40 mL振摇提取。取乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取裸花紫珠对照药材1 g,同法制

成对照药材溶液。照薄层色谱法(附录 0502)试验,吸取上述两种溶液各 10~20 μL ,分别点于同一用 0.5% 氢氧化钠溶液制备的硅胶 G 薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-浓氨溶液(17:2:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 3% 三氯化铝乙醇溶液,在 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,在紫外光灯(365 nm)下检视。

2.5 含量测定方法

按照高效液相色谱法(附录 0512)测定毛蕊花糖苷和木犀草苷含量。

2.5.1 色谱条件与系统适应性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-0.1% 冰醋酸溶液(20:80)为流动相;木犀草苷检测波长为 350 nm,毛蕊花糖苷检测波长为 330 nm;柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按木犀草苷和毛蕊花糖苷计算均不应低于 5000。

2.5.2 对照品溶液的制备

精密称取木犀草苷对照品、毛蕊花糖苷对照品适量,加入 70% 甲醇制成每 1 mL 各含木犀草苷 20 μg 、毛蕊花糖苷 40 μg 的混合溶液,即得。

2.5.3 供试品溶液的制备

取裸花紫珠提取液 1 mL,精密称量,置具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 50 mL,称定重量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)40 分钟,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.5.4 测定法

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得。

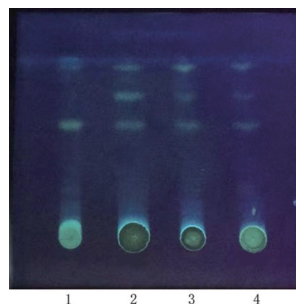
本品按干燥品计算,含木犀草苷($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$)不

得少于 0.050%;含毛蕊花糖苷($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$)不得少于 0.80%^[17]。

3 结果

3.1 薄层色谱鉴定结果

裸花紫珠提取液薄层色谱鉴定结果如图 1 所示。结果显示,不同倍数水的提取液样品与对照药材在相应的位置具有清晰的、相同颜色的荧光斑点。



注:1:裸花紫珠对照药材;2:10 倍水提取液样品;3:12 倍水提取液样品;4:14 倍水提取液样品

图 1 薄层色谱鉴别结果

3.2 料液比试验结果

不同料液比提取液中的主要有效成分毛蕊花糖苷和木犀草苷含量的方差分析结果如表 2 所示。从表 2 可知,14 倍数水的提取液中毛蕊花糖苷(4.775 g)和木犀草苷(0.658 g)的含量较高,但不同料液比对毛蕊花糖苷($P > 0.05$)和木犀草苷($P > 0.05$)含量的影响不存在显著性影响。因此,选择加 14 倍数水进行煎煮次数研究试验。

表 2 不同料液比提取液中毛蕊花糖苷及木犀草苷含量的方差分析结果

测定指标	组别	提取量(g/100 g)	平方和	自由度	均方	F	显著性
毛蕊花糖苷	16-3-1	3.608	组间	10.806	3	3.602	2.752
	14-3-1	4.775	组内	10.471	8	1.309	
	12-3-1	4.331	总计	21.277	11		
	10-3-1	2.269					
木犀草苷	16-3-1	0.392	组间	0.126	3	0.042	3.564
	14-3-1	0.658	组内	0.094	8	0.012	
	12-3-1	0.457	总计	0.219	11		
	10-3-1	0.434					

注:组别代表的是加水倍数-煎煮次数-每次煎煮时间,下文同。

表3 不同煎煮次数提取液中毛蕊花糖苷及木犀草苷含量的方差分析结果

测定指标	组别	提取量(g/100 g)	平方和	自由度	均方	F	显著性
毛蕊花糖苷	14-3-1	4.775	组间	17.41	2	8.705	5.929 0.038
	14-2-1	4.391	组内	8.808	6	1.468	
	14-1-1	1.651	总计	26.218	8		
木犀草苷	14-3-1	0.658	组间	0.44	2	0.22	32.333 0.001
	14-2-1	0.337	组内	0.041	6	0.007	
	14-1-1	0.12	总计	0.48	8		

3.3 煎煮次数试验结果

不同煎煮次数提取液中毛蕊花糖苷和木犀草苷含量的方差分析结果如表3所示。从表3可知煎煮次数对毛蕊花糖苷($P < 0.05$)和木犀草苷($P < 0.05$)含量的影响存在显著性影响, 其中煎煮次数为3次的毛蕊花糖苷(4.775 g)和木犀草苷(0.658 g)的含量最大。

3.4 正交试验结果

正交试验结果见表4、5。从表4可知提取次数对毛蕊花糖苷和木犀草苷的含量影响最大, 其次是提取时间, 加水量对其影响最小, 裸花紫珠水提的最佳组合是A3B3C2, 即14倍水提取3次, 每次1小时。

从表5可知, 不同提取条件对毛蕊花糖苷($P < 0.05$)和木犀草苷($P < 0.05$)含量的影响存在显著性影响。

4 讨论

黄酮类和苯丙素类是裸花紫珠的主要成分, 也是其特征性检测的常用指标成分, 其中黄酮类化合物木犀草苷和苯丙素类化合物毛蕊花糖苷是裸花紫珠止血、抗炎及抗病毒的主要成分, 是其质量评价的常用指标成分, 且毛蕊花糖苷对神经系统具有保护作用, 能明显减轻谷氨酸诱导的神经毒性^[7-8, 19-22]。因此, 本文选取木犀草苷和毛蕊花糖苷作为测量指标, 采用两个测量指标使研究结果更可信、更科学, 从而提高提取工艺的可信度和合理性。

裸花紫珠提取工艺相关研究较多, 目前常用于裸花紫珠提取的溶剂有乙醇和水两种。本研究从提高制剂工业化生产安全性和降低工业化生产成本出发, 结合裸花紫珠主要活性成分易溶于水

表4 正交试验结果

编号	因素			提取量平均值 (g/100 g)	
	A	B	C	毛蕊花糖苷	木犀草苷
1	1	1	1	0.77	0.04
2	1	2	2	3.952	0.269
3	1	3	3	2.269	0.434
4	2	1	2	2.559	0.249
5	2	2	3	2.305	0.398
6	2	3	1	3.42	0.361
7	3	1	3	2.56	0.204
8	3	2	1	2.687	0.29
9	3	3	2	4.775	0.658
K1	6.991	5.88	6.876		
K2	8.274	8.944	11.277		
K3	10.023	10.463	7.134		
极差R	1.011	1.528	1.467		
因素主次顺序	A < C < B				
优水平	A3	B3	C2		
K1	0.743	0.492	0.691		
K2	1.008	0.958	1.176		
K3	1.151	1.452	1.036		
极差R	0.136	0.32	0.162		
因素主次顺序	A < C < B				
优水平	A3	B3	C2		

的性质, 参照张仲等研究裸花紫珠水提工艺的方法选用水作为提取溶剂进行工艺研究^[18]。刘晓等研究发现裸花紫珠水提总黄酮含量最佳的料液比是1:10倍, 且溶剂用量对其总黄酮提取转移率影响不明显^[5]。因此, 本研究选用10倍、12倍、14倍及16倍的提取液进行研究料液比试验, 结果显示

表5 正交试验方差分析结果

		平方和	自由度	均方	F	显著性
毛蕊花糖苷	组间	31.182	8	3.898	3.269	0.018
	组内	21.464	18	1.192		
	总计	52.646	26			
木犀草苷	组间	0.706	8	0.088	9.699	0
	组内	0.164	18	0.009		
	总计	0.869	26			

料液比对木犀草苷、毛蕊花糖苷的含量影响不大,与刘晓等的研究结果一致。本研究还发现,随着提取次数的增加木犀草苷、毛蕊花糖苷的含量逐渐增加,提取次数为3时其含量最高;随着提取时间的增加,毛蕊花糖苷的含量先增加再减少,木犀草苷的含量逐渐增加,结合正交试验结果可知每次提取时间最佳为1小时;与其他学者研究的最佳水提工艺提取次数为3次,每次提取时间为1小时的结果一致^[18, 23]。

此外,用裸花紫珠不同成分作为测量指标其最佳提取工艺则不同,其中药材加水浸泡时间、三次加入不同提取溶剂量均会影响其含量。因此,今后还需要进一步研究裸花紫珠的提取工艺。

5 结论

本试验结果表明,裸花紫珠的最佳水提工艺为14倍水提取3次,每次1h,主要活性成分含量稳定,提取效率较高,这说明,水提工艺对裸花紫珠主要活性成分木犀草苷和毛蕊花糖苷无显著的影响,工艺可行。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1982, 65:37.
- [2] 裴凯旋. 皮炎汤联合点刺放血治疗激素性皮炎的临床观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [3] 郑东昆, 陈伟康, 马双成, 等. 裸花紫珠指纹图谱研究及10种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1776-1782.
- [4] 宋潇, 黄胜, 袁莉, 等. 裸花紫珠资源、化学成分及药理作用研究近况[J]. 中国医药导报, 2017, 14(6): 45-48.
- [5] 刘晓, 张鹏威, 项妮, 等. 正交试验法优选裸花紫珠的水提取工艺[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(8): 1044-1045.
- [6] 陈伟, 吴一菲. 裸花紫珠的药理活性及临床应用研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2015, 37(4): 210-212.
- [7] 张洁, 李宝泉, 冯锋, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297-3301.
- [8] 冯世秀, 张旻, 易博, 吴洪新. 裸花紫珠化学成分与药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(5): 1015-1026.
- [9] 杨远珊. 裸花紫珠片的临床应用进展[J]. 临床合理用药, 2012, 5(3C): 151-153.
- [10] 易博, 张旻, 林海, 等. 黎药裸花紫珠在小鼠体内止血活性部位的研究[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(3): 235-241.
- [11] 胡茵, 施泉龙. 裸花紫珠提取物在牙膏中的应用[J]. 口腔护理用品工业, 2020, 30(4): 23-25.
- [12] 孙安礼. 裸花紫珠片配合乙醇治疗口腔溃疡56例. 中医学报, 2010(3): 543.
- [13] 朱立新, 白雪峰. 裸花紫珠片治疗咽炎的临床观察. 中国误诊杂志, 2009(9): 2061-2062.
- [14] 刘小芬, 李顺祥. 裸花紫珠研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(4): 396-402.
- [15] 吉艺宽, 徐炜琳, 李少方, 等. 裸花紫珠提取物对鸡源大肠杆菌的体外抑菌效果[J]. 广东畜牧兽医科技, 2021, 46(3): 97-99.
- [16] 庄汝柏. 裸花紫珠末部分药效学、毒理学及临床效果观察[D]. 华南农业大学, 2018.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部-2020版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 378.
- [18] 张仲, 罗贤强, 周金娜, 等. 正交试验优化裸花紫珠水提取工艺及外用止血作用的评估[J]. 中国现代中药, 2018, 20(6): 734-737.
- [19] 董琳, 关薇薇, 盛琳, 等. HPLC同时测定裸花紫珠中4种黄酮[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 52-55.
- [20] 胡蓉, 姚闯, 李玉云, 等. HPLC法测定裸花紫珠药材中木犀草素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 271-272.
- [21] LEE KY, JEONG EJ, LEE HS, et al. Acteoside of Callicara dichot- omaattenuates scopolamine-induced memory impairments[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(1): 71-74.
- [22] 周欣欣. 裸花紫珠散剂制备工艺及质量标准研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020. DOI: 10.27787/d.cnki.ghrbs.2020.000377.
- [23] 王勇, 文苑, 李永辉. 正交试验优选裸花紫珠叶中苯乙醇苷类成分的水提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(08): 1856-1858.

间接免疫荧光检测猪瘟活疫苗效价方法的建立

陈建凯^{1,2}, 张璞^{1,2}, 赖月辉², 侯高伟², 周晓敏², 曾垠涛², 杨傲冰², 齐冬梅^{2*}

(1. 佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东 佛山 528231;

2. 广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要:为了寻找到猪瘟活疫苗(传代细胞源)效力检验的实验室替代方法,本研究将检验合格的疫苗按头份用专用稀释液10倍梯度稀释后,接种至长满猪睾丸细胞(ST细胞)单层的细胞板上,以猪瘟阳性血清为一抗、山羊抗猪IgG(FITC标记)为二抗,通过反应体系条件的优化,确定病毒接种细胞后培养72 h,一抗和二抗的稀释度为1:400倍,建立了猪瘟活疫苗(传代细胞源)成品苗的间接免疫荧光(Indirect immunofluorescence assay, IFA)检测方法;此方法敏感性、特异性和重复性良好。用建立的IFA方法检测10批次猪瘟活疫苗(传代细胞源)试验苗,结果为: $10^{4.67} \sim 10^{5.33} \text{TCID}_{50}/\text{头份}$ 。该方法的建立可为猪瘟活疫苗(传代细胞源)的质量控制提供技术支持和检验参考。

关键词:猪瘟病毒; 猪瘟活疫苗(传代细胞源); 间接免疫荧光

中图分类号:S851.34 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2022)05-0023-05

Establishment of an indirect immunofluorescence assay for classical swine fever live vaccine (cell line origin)

CHEN Jiankai^{1,2}, ZHANG Pu^{1,2}, LAI Yuehui², HOU Gaowei², ZHOU Xiaomin², ZENG Yintao²,

YANG Aobing², QI Dongmei^{2*}

(1. School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan Guangdong, 528231;

2. Guangdong Winsun Bio-Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou Guangdong, 511356)

Abstract: In order to find an alternative laboratory method for the efficacy test of classical swine fever live vaccine (cell line origin), in this study the qualified vaccine was 10 times gradiently diluted with special diluent by doses and inoculated into the cell plate covered with swine testicles cells and cultured for 72 h. The dilution of the positive serum of classical swine fever virus (CSFV) and the goat anti-pig IgG (FITC marker) was determined as 1:400 both. A method of indirect immunofluorescence assay (IFA) was established for detection of classical swine fever live vaccine (cell line origin), this method has good sensitivity, specificity and reproducibility. The IFA method was used to detect 10 batches of classical swine fever live vaccine (cell line origin), the results were $10^{4.67} \sim 10^{5.33} \text{TCID}_{50}/\text{dose}$. The established IFA detection method can provide technical support to quality control of classical swine fever live vaccine (cell line origin).

Keywords: Classical swine fever virus; Classical swine fever live vaccine (cell line origin); Indirect immunofluorescence assay

收稿日期:2022-03-11

作者简介:陈建凯,男,在读兽医硕士。E-mail:342163189@qq.com

*通讯作者:齐冬梅,女,博士,研究员,研究方向为兽用生物制品研发与生产。E-mail:qidongmei07@163.com

猪瘟(Classical swine fever, CSF)又称为猪霍乱,该病是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的急性、高度接触性、致死性传染病,给全球养猪业造成巨大的经济损失^[1]。疫苗接种仍是预防猪瘟的有效手段,因此猪瘟活疫苗的产品质量成为防控本病的关键,而疫苗中的有效病毒含量(效价),是决定疫苗质量的重要指标。传统猪瘟活疫苗的效力检验是用兔检验,测定兔体定型热法(RID),但RID法易受兔子个体差异和饲养条件等影响而导致结果可重复性差,且检测成本高^[2]。因此探索新的猪瘟活疫苗实验室效价检测方法,是行业发展的需求。间接免疫荧光检测方法(Indirect immunofluorescence assay, IFA)有敏感、特异且直观等特点,在许多病原检测中得到广泛应用,本研究建立了猪瘟活疫苗(传代细胞源)IFA方法,用以实验室快速检测猪瘟活疫苗效价^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

猪睾丸细胞(ST细胞)、猪瘟活疫苗(传代细胞源)(2021006批);猪瘟活疫苗(传代细胞源)(试202101~试202110批,20头份),猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株)(2021001批)、猪瘟病毒液(P20210503批)均由广东永顺生物制药股份有限公司提供。

1.2 主要试剂与耗材

MEM干粉培养基和胰酶均购自Gibco公司;新生牛血清购自内蒙古奥普赛生物科技有限公司;荧光素FITC标记的山羊抗猪IgG,购自Abcam公司;甲醇和丙酮均为分析纯,购自广州化学试剂厂;IFA专用稀释液由广东永顺生物制药股份有限公司研发部提供。

猪瘟病毒间接ELISA抗体检测试剂盒(试202101批)由广东永顺生物制药股份有限公司制备和提供;猪瘟病毒检测试剂盒(CSFV 20201111P)、非洲猪瘟病毒实时荧光RT-PCR检测试剂盒(ASFV2020006)、猪伪狂犬病抗原实时荧光RT-PCR检测试剂盒(PRV20201118P)、猪繁殖与呼吸综合征抗原检测试剂盒(PRRSV20210116P)、猪圆环病毒(Ⅱ型)抗原检测试剂盒(PCV2 20210308P)等抗原检测试剂盒均购自北京世纪元亨动物防疫

技术有限公司;牛病毒性腹泻/黏膜病抗原ELISA检测试剂盒(AA411)购自美国爱德士公司。

1.3 主要仪器

XDS-3倒置显微镜购自广州粤显光学仪器有限公司;Axiovert A1荧光倒置显微镜购自德国蔡司集团;BSC-1300ⅡA/B3生物安全柜购自苏净安泰公司;CFX Connect™实时荧光定量PCR仪购自BIO-RAD公司。

1.4 猪瘟阳性血清的制备及检验

选择猪瘟、非洲猪瘟、牛病毒性腹泻/黏膜病、猪伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒(Ⅱ型)等抗原和抗体阴性7~8周龄健康仔猪2头,免疫猪瘟活疫苗(传代细胞源)(2021006批)1头份,28天后加强免疫2头份。二免后2周采血用猪瘟病毒间接ELISA抗体检测试剂盒(试202101批)进行血清抗体效价的检测。根据试剂盒的说明书要求,标准阳性对照平均OD值=(孔1+孔2)/2;标准阴性对照平均OD值=(孔1+孔2)/2;IE值=样本OD值/标准阳性对照平均OD值×100%。当血清样本的IE值≥10%时,为猪瘟抗体阳性;当血清样本的IE值≤8%时,为猪瘟抗体阴性;当血清样本的IE值在8%~10%之间时,为可疑。可在数日后重新采样检测,如仍在此范围,判为阴性。选择IE值达到90%以上的猪采血收集血清,如均未达到则需加强免疫1次。

1.5 细胞及病毒的培养

将长满单层的ST细胞弃掉细胞营养液,用灭菌PBS(0.02 M, pH7.2)洗涤1次后加入适量胰酶EDTA细胞消化液进行消化,按适当比例进行传代,将ST细胞悬液分至96孔板细胞板,置37℃、含5%二氧化碳培养箱中培养,当细胞分裂生长至单层,可用于接毒。将猪瘟活疫苗(传代细胞源)先用无血清MEM细胞培养液稀释至1头份,然后用IFA专用稀释液作10倍系列稀释,取10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵3个稀释度,每个稀释度接种4孔,0.1 mL/孔,同时设置未接毒的正常细胞作对照,接种完毕置37℃、含5%二氧化碳培养箱中吸附2 h后弃液,补加细胞维持液0.1 mL/孔,置37℃、含5%二氧化碳培养箱中继续培养。

1.6 间接免疫荧光试验

将已接毒的96孔细胞培养板培养结束后,弃

去细胞维持液,每孔用PBS(0.02 M, pH 7.2)0.1 mL 洗涤1次,然后每孔加入0.1 mL预冷的甲醇和丙酮(体积比为1:1)固定液于2~8℃条件下固定30 min,至通风橱中弃掉固定液并晾干,用PBS(0.02 M, pH 7.2)洗涤3次,甩干。加入一定稀释度的猪瘟阳性血清(一抗),每孔0.1 mL,置37℃温箱中孵育60 min。PBS液洗涤3次,甩干,加入一定稀释度的荧光素FITC标记的山羊抗猪IgG(二抗),每孔0.1 mL,然后置37℃温箱中避光孵育60 min。PBS(0.02 M, pH 7.2)洗涤3次,甩干,于荧光显微镜下镜检。

1.6.1 病毒培养最佳时间的确定

将接毒后的96孔细胞培养板分别置37℃、含5%二氧化碳培养箱中继续培养72 h和96 h。培养结束后对96孔板上ST细胞进行固定,并按1.6方法进行IFA试验,根据荧光斑和染色亮度进行结果判定。

1.6.2 抗体最佳工作浓度的确定

配制一抗和二抗的稀释梯度分别为:1:200、1:400、1:600、1:800。利用不同一抗和二抗浓度的组合对猪瘟活疫苗(传代细胞源)(2021006批)抗原进行IFA的测定。选取荧光清晰、明亮且稀释度最大的一抗和二抗抗体稀释度为最佳稀释度。

1.7 敏感性试验

取病毒滴度为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/0.1 mL的猪瘟病毒液(P20210503批),用IFA专用稀释液将病毒液作倍比系列稀释,选择 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 共6个稀释度接种按1.5方法制备的ST细胞板,每个稀释度接种4孔,0.1 mL/孔;同时设置未接毒的ST细胞作对照,选择1.6.2方法中最适的一抗和二抗工作浓度进行敏感性检验。

1.8 特异性试验

选择ST细胞适性良好的猪伪狂犬病病毒进行特异性试验。将猪瘟活疫苗(传代细胞源)(2021006批)和猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株)接种按1.5方法制备的ST细胞板,同时设置未接毒的ST细胞作对照,选择1.6.2方法中最适的一抗和二抗工作浓度进行特异性检验。

1.9 重复性试验

按1.6方法对10批猪瘟活疫苗(传代细胞源)(试202101~试202110批)进行猪瘟效价的测定,相

同样品重复3次,以检测该方法的重复性。

2 结果与分析

2.1 猪瘟阳性血清的制备及检验结果

制备猪瘟阳性血清的2头猪于二免后2周采血,用猪瘟病毒间接ELISA抗体检测试剂盒(试202101批)进行猪瘟血清抗体效价的检测,检测结果为:IE值分别为98.13%、91.82%,采血,分离血清,无菌分装后于-80℃保存备用。

2.2 病毒培养最佳时间结果

根据IFA检测结果,ST细胞接毒后培养72 h、96 h可见较大面积的荧光斑且荧光亮度最亮。考虑到实际检测需要,将病毒最佳培养时间确定为接毒后72 h。不同培养时间IFA检测结果见图1。



注:A:病毒培养72 h; B:病毒培养96 h; C:阴性对照

图1 病毒培养72 h和96 h IFA检测结果

2.3 抗体最佳工作浓度结果

选择荧光清晰、明亮且稀释度最大的抗体稀释度为猪瘟阳性血清(一抗)和荧光素FITC标记的山羊抗猪IgG(二抗)的最佳工作浓度。根据镜检结果,当二抗稀释度为1:800时,一抗5个稀释度出现很弱的荧光或无荧光,当二抗在其他4个稀释度下,一抗稀释度在1:200~1:400时均可见明亮的特异性荧光,在1:800时荧光较弱。综合考虑实际应用和成本因素,将稀释度1:400作为猪瘟阳性血清(一抗)的最佳工作浓度,稀释度1:400作为荧光素FITC标记的山羊抗猪IgG(二抗)的最佳工作浓度。最佳工作浓度下,ST细胞胞浆内呈现明亮的翠绿色荧光,特异性荧光最明显。一抗、二抗不同工作浓度IFA检测结果见图2。

2.4 敏感性试验结果

根据2.3的试验结果,在已接种不同稀释度猪瘟病毒液(P20210503批)的细胞板中,加入1:400的猪瘟阳性血清(一抗)和1:400的荧光素FITC标记的山羊抗猪IgG(二抗)进行IFA检测,同时设正常

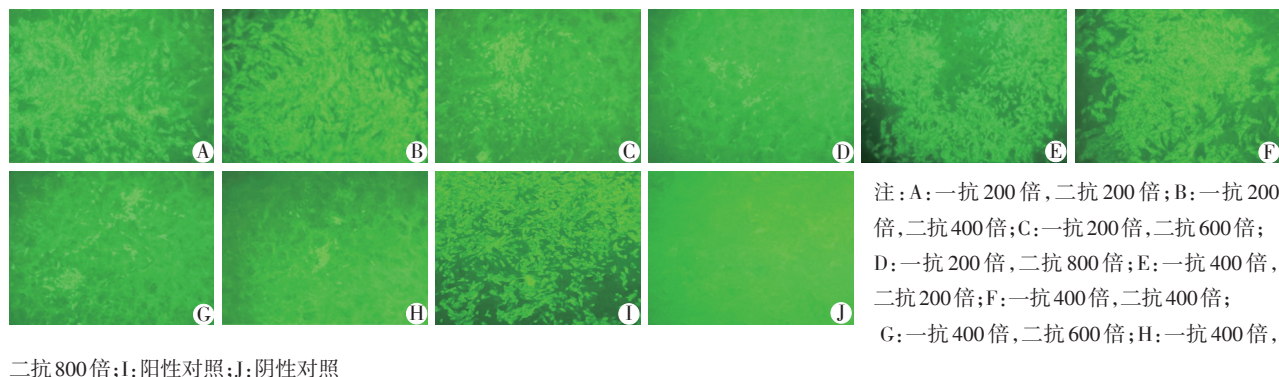


图2 一抗、二抗不同工作浓度 IFA 检测结果

细胞为空白对照。然后置荧光显微镜下观察,结果:猪瘟毒液(P20210503批)稀释至 10^{-2} ~ 10^{-6} 的细胞接种孔均出现典型的猪瘟特异性荧光,荧光显微镜下能清晰判断病毒浓度越高的细胞孔出现的荧光越多,病毒滴度越低的细胞孔出现的荧光越少,当猪瘟毒液(P20210503批)稀释至 10^{-7} 接种的4孔细胞均无猪瘟特异性荧光。结果表明,将猪瘟病毒液稀释至 10^{-6} 在荧光显微镜下仍可观察到典型的特异性绿色荧光,建立的 IFA 方法用于检测猪瘟病毒敏感性好。实验结果见图3。

2.5 特异性试验结果

选择 ST 细胞适应性良好的猪瘟病毒和猪伪狂犬病毒同时接种按 1.5 方法制备的细胞板,用建立的 IFA 方法检验特异性荧光。检验结果为:接种猪瘟活疫苗(传代细胞源)的细胞呈阳性的亮绿色荧光(图4A),接种猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株)(图4B)和阴性的 ST 细胞没有出现特异性的荧光(图4C),并出现一些细胞脱落现象。由以上结

果可知,所建立的 IFA 方法对 ST 细胞适应性良好的病毒具有良好的特异性。



注: A:猪瘟病毒; B:猪伪狂犬病毒; C:未接毒对照

图4 特异性检验结果

2.6 重复性检测结果

根据间接免疫荧光试验方法其最佳优化条件对 10 批猪瘟活疫苗进行效价测定,具体检测结果详见表 1。通过 3 次重复检测结果可知,每批猪瘟活疫苗效价都较高且稳定在 $10^{4.67}$ ~ $10^{5.33}$ TCID₅₀/头份,也验证了该 IFA 检测方法稳定,重复性好。

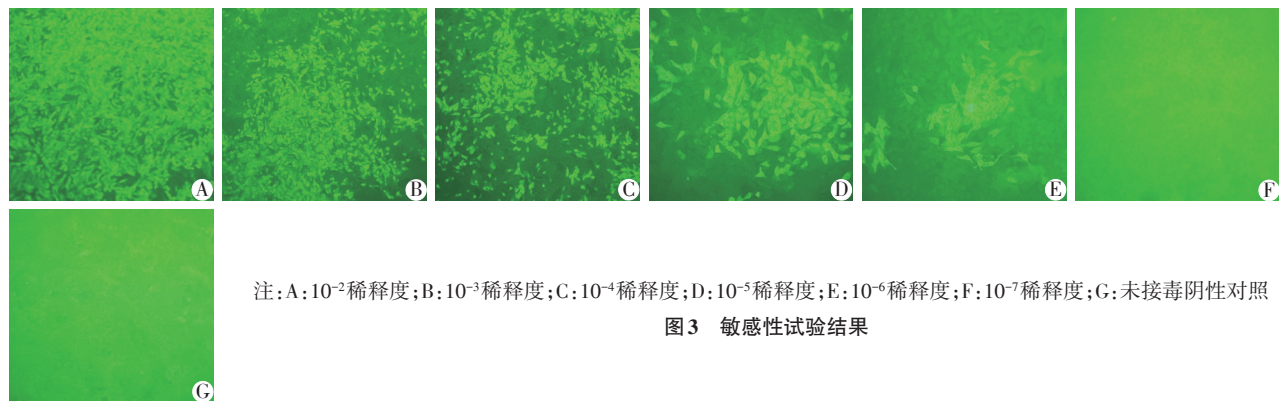


图3 敏感性试验结果

表1 猪瘟疫苗效价检测结果

疫苗批次	TCID ₅₀ /头份		
	一检	二检	三检
试202101	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
试202102	10 ^{4.67}	10 ^{4.67}	10 ^{4.67}
试202103	10 ^{4.67}	10 ^{4.67}	10 ^{4.67}
试202104	10 ^{4.67}	10 ⁵	10 ⁵
试202105	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
试202106	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
试202107	10 ⁵	10 ⁵	10 ^{5.33}
试202108	10 ^{4.67}	10 ⁵	10 ^{4.67}
试202109	10 ^{5.33}	10 ^{5.33}	10 ^{5.33}
试202110	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵

3 讨论

猪瘟病毒感染细胞后不产生细胞病变,最常用的检测方法是兔体定型热法,但是该方法受限于兔子品种、个体差异和饲养环境等影响,可重复性差;本动物攻毒则受制于使用猪瘟强毒需P3级别动物房等的限制,因此猪瘟活疫苗效价的实验室检测一直是一个迫切需要解决的问题。针对这个问题有许多学者进行了相关研究,葛叶等建立了实时荧光定量RT-PCR方法,唐红慧、王海光等建立了ELISA方法,李少丽采用单克隆抗体建立了IFA方法检验猪瘟疫苗效价等^[5-8]。本研究成功建立了检测猪瘟活疫苗效价的间接免疫荧光方法,对多个一抗和二抗浓度组合进行比较优化,确定了猪瘟阳性血清(一抗)和FITC标记的山羊抗猪IgG(二抗)最佳工作浓度为1:400倍稀释。敏感性和特异性良好,重复3次检测10批猪瘟活疫苗(传代细胞源),结果均稳定且疫苗效价高。

同时,本研究采用猪瘟单克隆抗体为一抗,FITC标记的羊抗鼠IgG为二抗,做了5批预实验,阳性荧光没有采用猪瘟阳性血清为一抗,FITC标记的羊抗猪IgG为二抗的荧光清晰明亮,所以选择猪瘟阳性血清而没有选择单克隆抗体建立该方法,相比较单克隆抗体,阳性血清制备方法简单,

一次即可制备大量,能有效降低检测费用。这与牛成明等人采用猪瘟阳性血清建立IFA方法检验猪瘟活疫苗效价的报道相一致^[9]。

4 小结

猪瘟阳性血清的制备其免疫程序简单明确、阴性动物筛选相对容易、制备成本更加经济,用阳性血清建立的IFA方法更加适合动物疫苗生产企业大规模检验猪瘟半成品及成品效价,便于对猪瘟活疫苗的质量把控。同时,免疫荧光检测技术具有简单、快速、直观等诸多优点。因此,本研究建立的IFA检测方法可为猪瘟活疫苗(传代细胞源)半成品及成品检验提供参考,为产品质量控制提供技术支持。

参考文献:

- [1] 斯特劳,阿莱尔,蒙家林,等.猪病学[M].赵德明,张仲秋,沈建忠,等译.9版.北京:中国农业大学出版社,2008.
- [2] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典:2020年版三部[M].北京:中国农业出版社,2020.
- [3] TEIFKE J P, LANGE E, ROBERT K, et al. Nictitating membrane as a potentially useful postmortem diagnostic specimen for classical swine fever[J].Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2005, 17(4): 341-345.
- [4] 朱妍,李素,王文成,等.猪瘟病毒石门株与兔化弱毒疫苗株之间抗原差异的单克隆抗体分析[J].中国兽医科学,2008, 38(4):293-296.
- [5] 葛叶,张兴娟,朱庆虎,等.荧光定量RT-PCR方法与兔体定型热试验对于检测猪瘟兔化弱毒疫苗的平行关系[J].中国预防兽医学报,2011, 33(9):699-703.
- [6] 唐红慧,杜希珍,刘大伟,等.应用猪瘟抗原/血清ELISA测定猪瘟兔化弱毒疫苗中的病毒含量[J].金陵科技学院学报,2010, 26(4):73-78.
- [7] 王海光,宁宜宝,赖月辉,等.猪瘟活疫苗效力检验替代方法的研究[J].中国兽药杂志,2015, 49(3): 1-6
- [8] 李少丽.基于E2蛋白的猪瘟病毒IFA检测方法建立及亚单位疫苗的初步研制[D].博士学位论文.扬州:扬州大学,2019.
- [9] 牛成明,姚静,杨灵芝,等.猪瘟兔化弱毒间接免疫荧光鉴定方法的建立[J].中国动物检疫,2016, 33(10):86-89.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.06

HPLC-MS/MS 同位素内标法测定鸡蛋中 14种喹诺酮类药物残留量

刘佩怡, 伍宏凯*, 梁祺琦, 李律雯

(广东省农产品质量安全中心(广东省绿色食品发展中心), 广东 广州 510230)

摘要:本研究建立了同时测定鸡蛋中14种喹诺酮类药物残留的高效液相色谱-串联质谱方法。样品经EDTA-Mellvaine缓冲液提取,正己烷脱脂,HLB固相萃取柱净化,反相C18色谱柱分离,采用多反应监测正离子模式测定,使用同位素内标法定量。在优化条件下,14种喹诺酮类药物均能达到检测限0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在2~100 ng/mL 的质量浓度范围内线性良好,相关系数 r 均大于0.99。在空白鸡蛋中添加2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平的药物回收试验中,平均回收率在83.9%~110.7%之间,批内变异系数在1.5%~13.7%之间($n=6$),批间变异系数在4.5%~13.1%之间($n=18$)。结果表明,该方法灵敏、准确、重复性好,适用于鸡蛋中喹诺酮类药物残留的定性定量检测。

关键词: 鸡蛋; 喹诺酮类药物; 同位素内标法; 高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:S859.84 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2022)05-0028-07

Determination of 14 quinolones residues in eggs by HPLC-MS/MS with isotopic internal standard

LIU Peiyi, WU Hongkai*, LIANG Qiqi, LI Luwen

(Guangdong agriculture products quality and safety center, Guangzhou Guangdong 510230)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for the simultaneous determination of 14 quinolones residues in eggs. The samples were extracted with EDTA-Mellvaine buffer, followed by defatted with n-hexane, and purified by HLB solid phase extraction column, separated by reversed-phase C18 column, determined by multiple reaction monitoring positive ion mode, and quantified by isotope internal standard method. Under the optimized conditions, the detection limit and quantification limit of 14 quinolones were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The linearity was fine in the range of 2~100 ng/mL , and the correlation coefficients r was greater than 0.99. Adding 2, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to blank eggs sample, the average recoveries were 83.9%~110.7%, the intra-assay coefficient of variation were between 1.5% and 13.7% ($n=6$), and the inter-assay coefficient of variation were from 4.5% to 13.1% ($n=18$). The results showed that the method was sensitive, accurate, and reproducible, and was suitable for the qualitative and quantitative detection of quinolones residues in eggs.

Keywords: Eggs; Quinolones; Isotopic internal standard method; High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

收稿日期:2022-04-20

作者简介:刘佩怡(1983-),女,广州人,从事兽药残留研究。E-mail:329840931@qq.com

*通讯作者:伍宏凯(1980-),男,兽医师,研究方向:兽药残留。E-mail:2172388@qq.com

鸡蛋作为优质的蛋白质来源之一, 在居民的饮食结构和营养需求中占据着重要的地位, 然而鸡蛋中的兽药残留却成为人们食用鸡蛋的安全隐患, 其中喹诺酮类药物是鸡蛋残留的主要兽药之一。如果长期食用残留喹诺酮类的食品可造成慢性中毒, 引起细菌耐药性等后果^[1]。

我国 2015 年开始在食品动物中停止使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种兽药; 国家标准 GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定蛋鸡产蛋期禁用达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星、氟甲喹、噁喹酸、沙拉沙星等 6 种喹诺酮类药物^[2-3]。

2021 年农产品质量安全监管司发布的关于《食用农产品“治违禁 控药残 促提升”三年行动方案》中就把“一枚蛋”(鸡蛋)纳入治理的重点对象。为了保障人们群众“舌尖上的安全”, 建立准确可靠的检测方法显得尤为重要。目前, 日常检测中使用的标准方法主要为液相色谱法与液质联用法, 而液质联用技术将色谱和质谱的优点有效的结合起来, 具有分离能力强、灵敏度高、可对检测组分进行定性分析等优势, 已成为当下兽药残留监控检测的主要手段^[5-7]。GB/T 21312-2007 是目前主要检测鸡蛋中喹诺酮类残留的 HPLC-MS/MS 方法, 但在实际操作中发现该方法存在实验耗时长, 结果平行性差, 甚至容易出现堵柱而造成实验失败的状况。本实验在此方法基础上进行了前处理条件的优化, 并引入了同位素内标定量, 建立了鸡蛋中 14 种喹诺酮类多残留 HPLC-MS/MS 方法。优化后的方法具有更高的灵敏度, 前处理便捷, 结果准确, 重复性好, 适用于日常进行大批量的鸡蛋中喹诺酮类药物残留的定性定量检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

岛津 LC-20A 型液相色谱仪, 日本岛津公司; API 4000 电喷雾-串联四级杆质谱仪, 配 Analyst 4.1.5 软件, 美国应用生物系统公司; CPA225D 型分析天平(感量 0.00001 g), 德国 sartorius 公司; BS 300S-WEI 型天平(感量 0.001 g), 德国 sartorius 公司; 5804 R 冷冻型离心机, 德国 Eppendorf 公司; 5B-5200D 型超声仪, 宁波新芝; Millipore 纯水机; IKA

MS3 型涡旋混合器, 德国 IKA 公司; HLB 固相萃取柱, 规格 200 mg/6 mL, 美国 walters 公司;

1.2 试剂

乙腈、甲醇、甲酸、正己烷均为色谱纯; 柠檬酸、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠为分析纯; 实验用水为超纯水。恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、依诺沙星、洛美沙星、萘啶酸、噁喹酸、氟甲喹、西诺沙星、达氟沙星 13 种喹诺酮类混标溶液: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 吡哌酸; 恩诺沙星-D5、诺氟沙星-D5、培氟沙星-D5、环丙沙星-D8、氧氟沙星-D3、沙拉沙星-D8、依诺沙星-D8、洛美沙星-D5、萘啶酸-D5、噁喹酸-D5、氟甲喹-13C3、西诺沙星-D5、达氟沙星-D3 13 种内标混合溶液: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 均购自天津阿尔塔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制

取吡哌酸对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇/二甲基亚砜(3:7)溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。精密移取上述吡哌酸标准储备液 1 mL 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中间标准储备液。14 种喹诺酮类药物混合标准工作液: 分别精密移取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吡哌酸储备液和 13 种喹诺酮类药物混合标准溶液 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。13 种喹诺酮类药物内标混合工作液: 精密移取 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 13 种喹诺酮类药物内标混合标准溶液 1 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配制成 200 ng/mL 的标准工作液。

1.3.2 色谱条件

色谱柱: XBridge C 18 (2.1 \times 150 mm, 3.5 μm), 美国 Waters 公司; 流动相 A: [40+60 甲醇-乙腈]; 流动相 B: 0.2% 甲酸水溶液; 流速 0.3 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 20.0 μL ; 梯度洗脱程序见表 1。

1.3.3 质谱条件

采用多反应监测(MRM)扫描模式; 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描; 电喷雾电压 5500 V, 离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$, 气帘气压力 25 kPa, 辅助加热压力 60 kPa, 射入电压(EP)10 V。质谱参数见表 2。

1.3.4 样品前处理

称取均质试样 2.0 g(精确到 0.01 g)置 50 mL 离

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

时间/min	A 相:甲醇-乙腈/%	B 相:0.2%甲酸水溶液
0	10	90
6	30	70
9	50	50
9.5	100	0
10.5	100	0
11	10	90
15	10	90

心管中,加入 100 μ L 混合内标溶液(200 ng/mL),加入 10 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲液,涡旋混合,超声提取 10 min, 10000 r/min(温度设置 4 $^{\circ}$ C)离心 10 min,上清液转移至另一 50 mL 离心管

中。用 10 mL EDTA-McIlvaine 缓冲液重复提取一次。合并两次上清液,混匀。加入正己烷 10 mL,中速涡旋混合 1 min。10000 r/min(温度设置 4 $^{\circ}$ C)离心 10 min,吸取下清液 10 mL 备用。

HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL)依次用 6 mL 甲醇、6 mL 水预洗活化。取上述备用液 10.0 mL 以 1 mL/min 速度过柱,弃去滤液,用 6 mL 5%甲醇水溶液淋洗,抽干小柱。用 6 mL 甲醇洗脱,洗脱液于 45 $^{\circ}$ C 条件下氮气吹干。用 1 mL 0.2%甲酸水溶液涡旋复溶,过 0.22 μ m 微孔滤膜,供 HPLC-MS/MS 测定。

1.3.5 标准工作曲线的绘制

采用空白基质匹配标准溶液制得标准曲线。

表 2 14 种喹诺酮类药物及 13 种同位素内标物的质谱参数

化合物	母离子	子离子	去簇电压 DP	碰撞能量 CE	同位素内标物
吡哌酸	304.2	286.3*/189.0	38	27/43	培氟沙星-D 5
恩诺沙星	360.2	342.2*/316.3	38	29/27	恩诺沙星-D 5
诺氟沙星	320.1	302.2*/276.3	100	29/24	诺氟沙星-D 5
培氟沙星	334.1	316.2*/290.2	100	28/25	培氟沙星-D5
环丙沙星	332.1	314.2*/288.2	100	28/25	环丙沙星-D8
氧氟沙星	362.2	318.3*/261.2	100	26/37	氧氟沙星-D3
沙拉沙星	386.1	342.2*/299.2	106	26/37	沙拉沙星-D8
依诺沙星	321.1	303.2*/234.2	100	26/31	依诺沙星-D8
洛美沙星	352.2	265.2*/308.3	100	30/24	洛美沙星-D5
萘啶酸	233.1	215.1*/187.0	52	21/36	萘啶酸-D5
噁喹酸	262.1	244.1*/216.1	86	23/40	噁喹酸-D5
氟甲喹	262.1	244.1*/202.1	86	23/45	氟甲喹-13C3
西诺沙星	263.2	245.1*/217.2	72	22/31	西诺沙星-D5
达氟沙星	358.1	340.3*/283.3	106	30/33	达氟沙星-D3
恩诺沙星-D5	365.2	321.2	66	27	
诺氟沙星-D5	325.2	307.2	102	29	
培氟沙星-D5	339.2	321.3	106	29	
环丙沙星-D8	340.2	322.3	109	30	
氧氟沙星-D3	365.2	321.3	61	28	
沙拉沙星-D8	394.1	350.2	110	27	
依诺沙星-D8	329.2	311.3	102	29	
洛美沙星-D5	357.2	270.2	90	33	
萘啶酸-D5	238.2	220.1	81	22	
噁喹酸-D5	267.1	249.1	85	25	
氟甲喹-13C3	265.1	247.1	93	24	
西诺沙星-D5	268.1	250.1	82	23	
达氟沙星-D3	361.2	343.1	81	32	

注: *:定量离子

按照“1.3.4”方法处理, 在空白样品经提取净化吹干后的残余物中添加标准工作液得 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的系列标准工作液, 其中内标浓度为 10 ng/mL。

1.3.6 样品的回收率与精密度

取空白样品, 分别添加 2、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度, 按“1.3.4”方法处理。每个浓度做 6 个平行样, 连续做 3 批样品, 计算回收率与批内批间相对标准偏差。

1.3.7 检测限与定量限

采用空白试样添加低浓度标准品, 按“1.3.4”方法处理, 上机检测, 以信噪比(S/N) ≥ 3 为检测限, 以S/N ≥ 10 为定量限。

2 实验结果

2.1 液质分析与测定

图 1 为空白基质匹配标准溶液的总离子流图 (2 ng/mL); 图 2 为 14 种喹诺酮类药物的 MRM 离子流图 (2 ng/mL)。

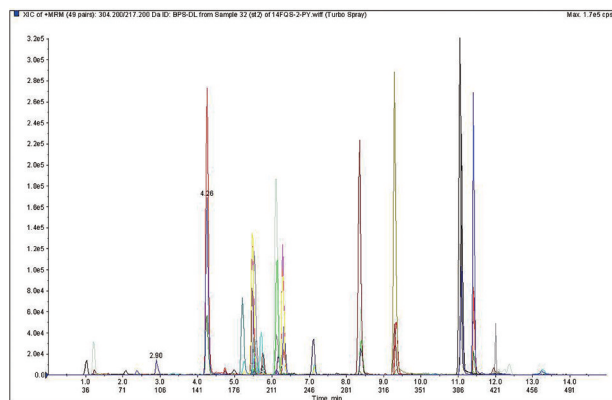
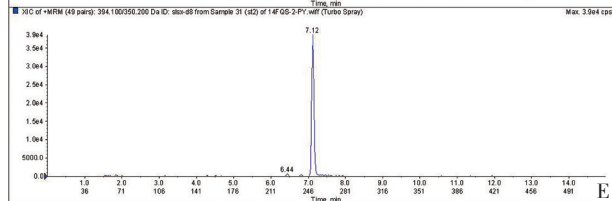
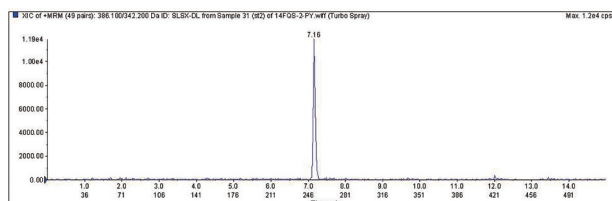
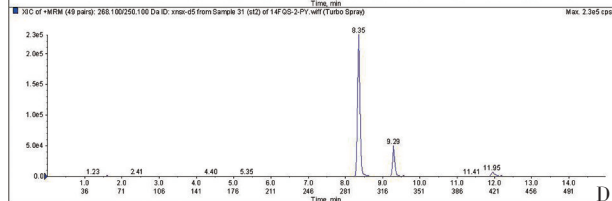
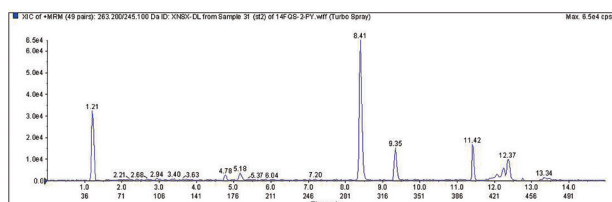
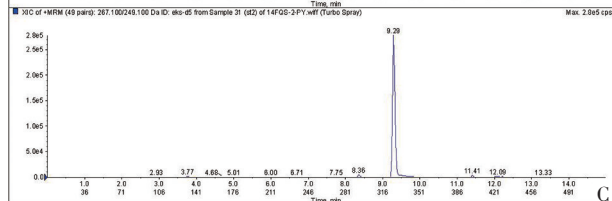
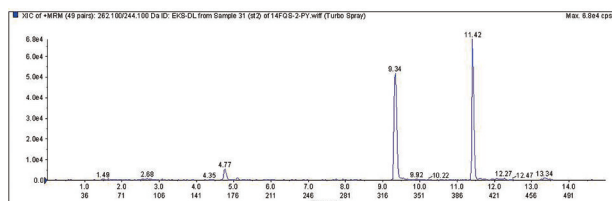
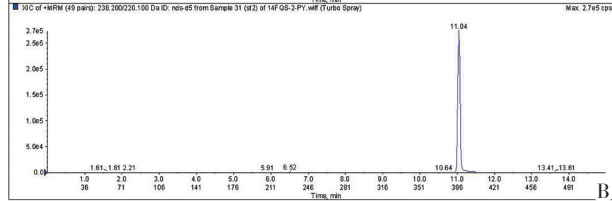
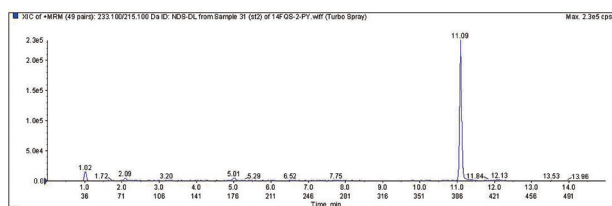
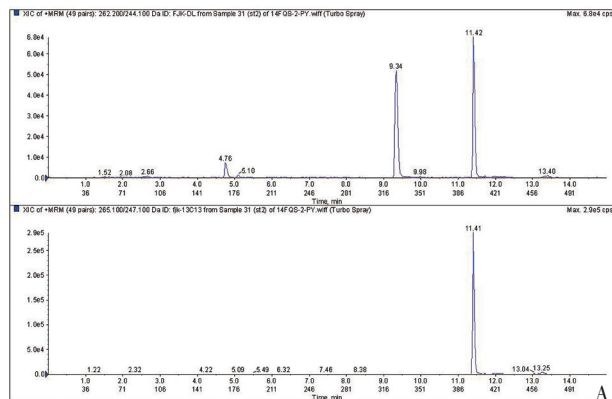
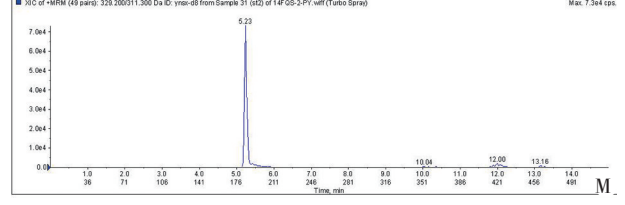
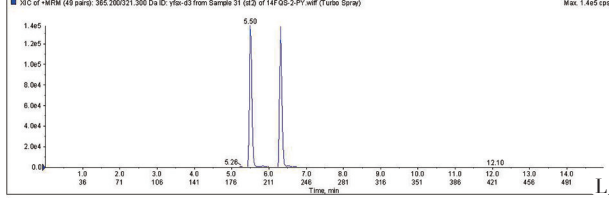
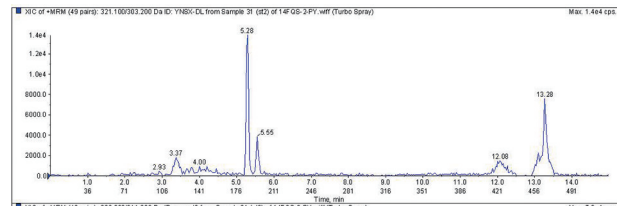
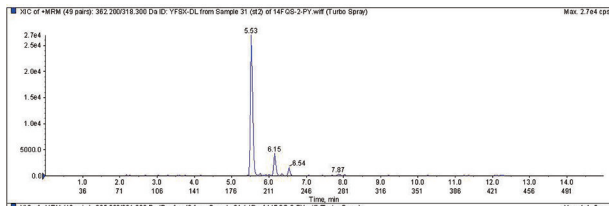
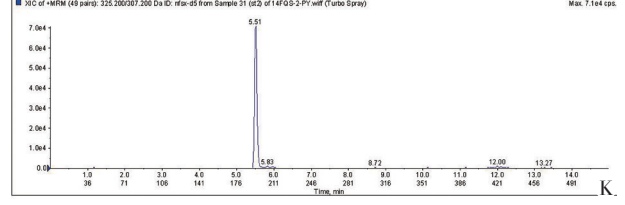
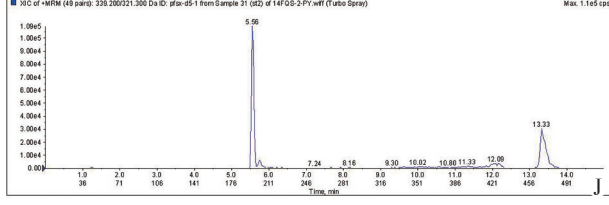
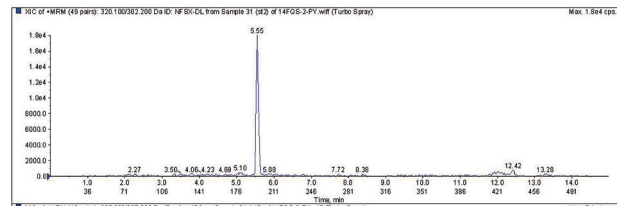
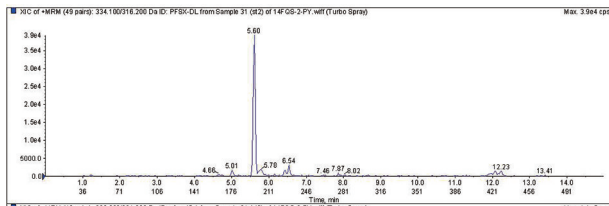
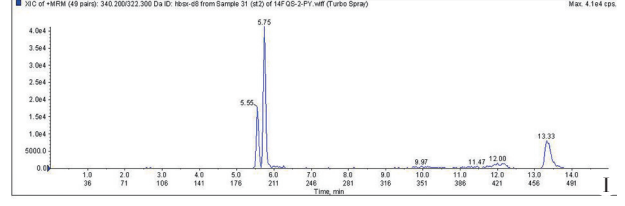
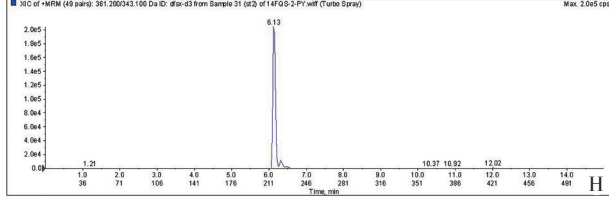
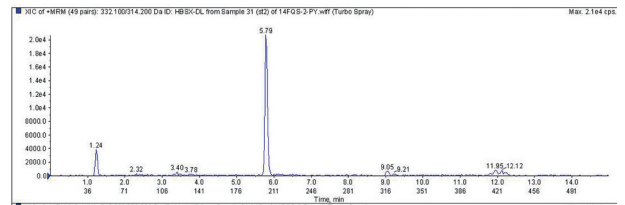
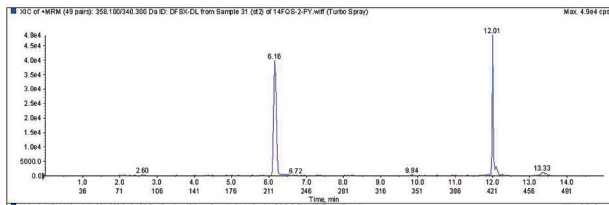
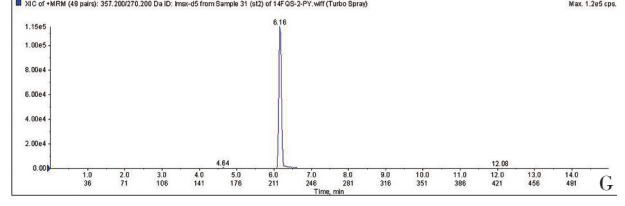
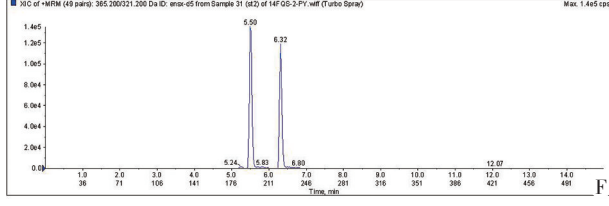
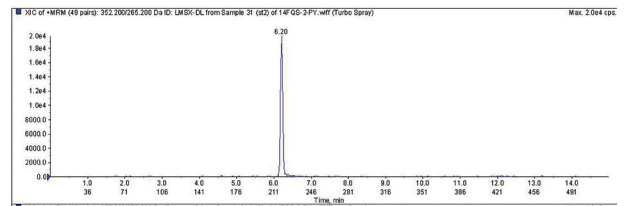
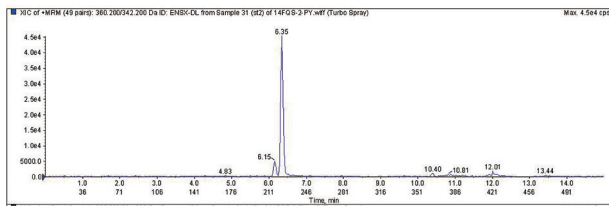
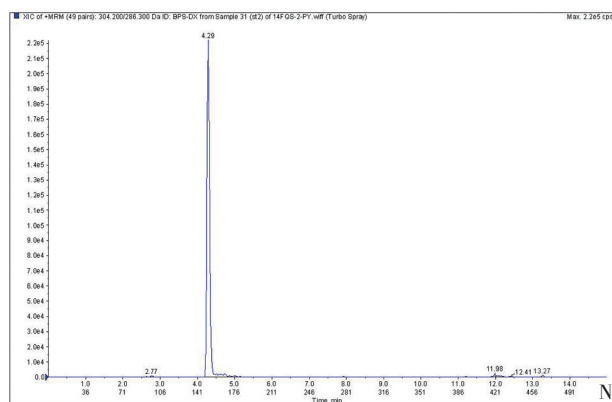


图 1 空白基质匹配标准溶液的总离子流图 (2 ng/mL)







注: A: 氟甲喹与氟甲喹-13C3; B: 萘啶酸与萘啶酸-D5; C: 噁喹酸与噁喹酸-D5; D: 西诺沙星与西诺沙星-D5; E: 沙拉沙星与沙拉沙星-D8; F: 恩诺沙星与恩诺沙星-D5; G: 洛美沙星与洛美沙星-D5; H: 达氟沙星与达氟沙星-D3; I: 环丙沙星与环丙沙星-D8; J: 培氟沙星与培氟沙星-D5; K: 诺氟沙星与诺氟沙星-D5; L: 氧氟沙星与氧氟沙星-D3; M: 依诺沙星与依诺沙星-D8; N: 吡哌酸

图2 14种喹诺酮类药物的MRM离子流图(2 ng/mL)

2.2 标准曲线

按“1.3.5”对系列标准工作液进行测定, 以待测物质的质量浓度为横坐标, 以标准品与同位素内标物峰面积比值y为纵坐标, 分别绘制14种喹诺酮类药物的标准溶液工作曲线, 由表3可知, 14种喹诺酮类药物在2~100 ng/mL范围内呈良好的线性关系。

2.3 回收率与精密度

用空白鸡蛋添加后进行方法回收率试验, 结果见表4。由表4可知, 14种喹诺酮类药物在2、5、

表3 14种喹诺酮类药物的线性方程与相关系数

化合物	回归方程	相关系数r
吡哌酸	y=0.462x+0.957	0.9946
恩诺沙星	y=0.0751x+0.0912	0.9944
诺氟沙星	y=0.0537x+0.00115	0.9983
培氟沙星	y=0.0867x+0.0393	0.9987
环丙沙星	y=0.0985x-0.0227	0.9991
氧氟沙星	y=0.0421x+0.00531	0.9993
沙拉沙星	y=0.0739x+0.00484	0.9976
依诺沙星	y=0.059x-0.00965	0.9939
洛美沙星	y=0.0377x+0.00969	0.9987
萘啶酸	y=0.128x+0.242	0.9921
噁喹酸	y=0.0334x+0.0465	0.9957
氟甲喹	y=0.07x+0.0431	0.9972
西诺沙星	y=0.0652x+0.0564	0.9980
达氟沙星	y=0.0434x+0.0457	0.9985

表4 鸡蛋中喹诺酮类药物残留回收率及批内批间相对标准偏差

化合物	添加浓度(μg/kg)	平均回收率%(批内相对标准偏差% n=6)			批间相对标准偏差%(n=18)
		第1批	第2批	第3批	
吡哌酸	2	101.4(6.4)	106.8(4.8)	105.6(4.3)	5.4
	5	101.0(5.5)	108.2(3.1)	104.7(1.5)	4.5
	10	89.2(6.9)	101.7(4.6)	93.8(3.1)	7.3
恩诺沙星	2	99.8(8.0)	95.7(4.7)	98.7(2.7)	5.6
	5	109.4(7.2)	102.7(3.9)	107.5(5.3)	6.0
	10	110.7(5.1)	100.7(3.9)	106.4(2.1)	6.0
诺氟沙星	2	88.8(6.3)	98.6(5.2)	93.5(6.5)	7.1
	5	91.1(1.5)	98.1(3.1)	91.8(5.0)	4.8
	10	87.4(5.6)	100.2(4.8)	95.3(3.9)	7.3
培氟沙星	2	101.5(6.5)	95.1(4.7)	105.3(6.4)	7.1
	5	104.3(6.5)	98.3(6.7)	102.8(5.3)	6.4
	10	96.4(6.9)	91.7(2.6)	100.9(4.4)	6.2
环丙沙星	2	100.0(8.2)	93.9(6.4)	104.6(3.2)	7.5
	5	104.2(6.1)	94.0(3.3)	107.3(5.2)	7.9
	10	99.0(1.8)	95.3(6.9)	101.1(2.8)	4.8
氧氟沙星	2	96.9(10.9)	88.0(3.6)	92.2(3.9)	7.9
	5	100.9(6.4)	89.1(4.7)	95.4(2.6)	7.0
	10	97.9(4.8)	87.0(3.1)	95.6(2.7)	6.2
沙拉沙星	2	90.6(13.3)	87.8(8.0)	88.9(5.5)	9.1
	5	89.4(4.2)	94.9(7.5)	92.6(3.2)	5.6
	10	90.8(5.7)	97.3(4.7)	93.6(5.1)	5.7
依诺沙星	2	95.7(8.8)	97.8(12.8)	88.2(4.4)	10.1
	5	94.9(4.1)	104.4(4.1)	99.1(5.9)	6.0
	10	97.2(5.5)	104.2(5.1)	95.2(4.7)	6.2
洛美沙星	2	103.0(9.7)	94.4(3.8)	95.2(8.8)	8.5
	5	95.2(7.1)	91.0(5.8)	95.3(1.6)	5.5
	10	99.0(4.6)	94.0(6.0)	95.8(6.0)	5.7
萘啶酸	2	92.7(4.8)	89.3(3.2)	99.5(4.7)	6.2
	5	99.9(6.2)	92.5(2.4)	102.8(3.3)	6.1
	10	90.6(3.3)	89.6(2.0)	98.4(4.2)	5.4
噁喹酸	2	92.2(8.2)	105.3(8.3)	103.8(7.2)	9.5
	5	92.8(4.8)	99.7(5.3)	101.5(5.4)	6.1
	10	97.1(2.4)	102.9(3.2)	102.8(5.9)	4.8
氟甲喹	2	94.8(10.4)	86.1(5.5)	103.5(9.6)	11.4
	5	98.1(8.8)	91.6(13.7)	108.4(12.0)	13.1
	10	99.6(11.6)	95.6(8.0)	103.6(9.6)	9.9
西诺沙星	2	93.4(7.4)	87.6(3.5)	96.1(5.6)	6.7
	5	96.1(4.9)	89.4(2.8)	103.3(2.9)	7.0
	10	95.1(3.9)	87.5(3.7)	102.7(2.4)	7.4
达氟沙星	2	105.1(7.3)	100.0(6.9)	108.4(4.3)	6.8
	5	97.8(3.8)	88.1(6.7)	90.6(10.0)	8.2
	10	89.8(4.4)	83.9(4.6)	98.2(6.5)	8.4

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平的平均回收率在 83.9% ~ 110.7%, 批内变异系数在 1.5% ~ 13.7% ($n=6$), 批间变异系数在 4.5% ~ 13.1% ($n=18$)。

2.4 检测限与定量限

本方法 14 种喹诺酮类药物均达到检测限 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 讨论

3.1 提取条件的优化

鸡蛋是一种含有大量卵磷脂、核黄素、蛋白质和脂肪等复杂体系的样本, GB/T 21312-2007 方法对鸡蛋样本采用 40 mL EDTA-McIlvaine 缓冲液进行一次提取, 鸡蛋中大部分成分被提取到缓冲液中, 高速离心后仍呈浑浊状, 加之过柱量大, 往往导致过柱耗时长且很易出现堵柱而实验失败的状况^[8]。本实验参考了陈蕾等人的方法, 采用 10 mL 正己烷脱脂 1 次即能达到脱脂的效果, 在低温高速离心后即可得到澄清的液体^[9]。此步骤优化后, 大大提高了过柱的效率, 同时降低了基质效应。

3.2 基质效应

LC-ESI-MS/MS 普遍存在基质效应, 其直接影响到分析结果的准确性和精密度^[10]。采用空白基质匹配标准溶液与同浓度的纯溶剂标准液中待测物的离子强度进行比较, 观察基质效应, 发现 14 种喹诺酮类药物均存在不同程度的基质效应, 为了尽可能降低基质效应的影响, 本实验方法采取了以下有效措施: ①在保证方法灵敏度的前提下减少称样量; ②采用固相萃取柱净化, 能有效去除基质中大部分杂质; ③采用同位素内标物对检测结果进行校正; ④采用空白基质匹配标准校正法进行校正^[8, 10]。

3.3 同位素内标物

同位素内标物因其性质与目标物相似, 在样品中损失和受基质影响程度相近, 因此可以降低基质效应和提高定量的准确性^[11]。本方法除了吡哌酸未能购买到对应的同位素内标物, 其余 13 种药物均有一一对应的同位素内标。在选择与吡哌酸匹配的内标物时主要综合考虑了回收率与基质效应, 这两个方面均应与吡哌酸相近, 最终确定选用培氟沙星-D5。

3.4 色谱柱的选择

本实验比较了粒径不同的 XBridge C 18 柱, 分

别为 5 μm 与 3.5 μm 两种粒径, 二者均能得到峰型较好的色谱峰, 但个别药物存在杂质峰干扰, 5 μm 粒径色谱柱不能达到满意的分离度。3.5 μm 粒径因柱效更高, 主峰与杂质峰在相同条件下能较好的分离, 并且峰型更优, 故最终选择 3.5 μm 粒径色谱柱。

4 结论

本实验通过优化前处理方法, 采用同位素内标法定量, 建立的鸡蛋中 14 种喹诺酮类多残留的 HPLC-MS/MS 方法操作简便易行, 灵敏度高, 回收率高, 重复性好, 适用于日常进行大批量的鸡蛋中喹诺酮类多残留的定性定量检测。

参考文献:

- [1] 彭文绣, 李璇, 成昕. 鸡蛋中喹诺酮类兽药残留现状及对策建议[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(10): 76-81.
- [2] 农业农村部. 中华人民共和国农业部公告(第 2292 号)[EB/OL]. 2015-09-07. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm.
- [3] GB 31650-2019. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [4] 农业农村部. 关于印发《食用农产品“治违禁 控药残 促提升”三年行动方案》的通知(农质发[2021] 6 号)[EB/OL]. 2021-05-31. http://www.moa.gov.cn/govpublic/ncpzlaq/202106/t20210611_6369557.htm.
- [5] 中华人民共和国农业部. 鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量的测定高效液相色谱法(农业部 781 号公告-6-2006[S]. 2006-12-16.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中 14 种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法(GB/T 21312-2007)[S]. 2007-10-29.
- [7] 李倩, 王甲, 张玉洁, 等. 动物性食品中喹诺酮类药物残留检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 8(12): 3016-3022.
- [8] 黄碧慧. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 7 种喹诺酮类药物的基质效应[J]. 福建分析测试, 2021, 30(1): 1-6.
- [9] 陈蕾, 达列亚·阿合买提, 张崇威, 等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留量前处理方法的优化[J]. 中国兽药杂志, 2021, 55(11): 22-28.
- [10] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 321-332.
- [11] 廖朝选, 黄永桥, 毛敏霞, 等. UHPLC-MS/MS 同位素内标法测定豆制品中 16 种喹诺酮类药物残留[J]. 中国调味料, 2010, 45(8): 138-142.

猪流行性腹泻及其疫苗研究现状

应碧云^{1,2,3}, 朱利塞^{2,3}, 向蕊^{1,2,3}, 李祎云^{1,2,3}, 白挨泉^{1,2*}, 王贵平^{2,3}, 贾爱卿^{2,3*}

(1. 佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231;

2. 广东海大畜牧兽医研究院有限公司, 广东 广州 511400;

3. 广东省养猪与猪病防控技术研究企业重点实验室, 广东 广州 511400)

摘要:猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是目前引起猪群病毒性腹泻的主要病原之一, 给我国乃至世界养猪业造成巨大经济损失。临床上7日龄以内的仔猪发病率最高, 病死率可达100%, 目前, 疫苗仍是预防PEDV的重要手段。本文从流行病学、临床症状与疫苗研究现状等方面分析传统疫苗免疫效果差的原因, 阐述PEDV的基本情况及其免疫防控, 为新型疫苗研制提供理论参考。

关键词:猪流行性腹泻; 疫苗; 变异; S蛋白

中图分类号:S852.65*1 文献标识码:A 文章编号:1005-8567(2022)05-0035-06

Research status of porcine epidemic diarrhea and its vaccine

YING Biyun^{1,2,3}, ZHU Lisi^{2,3}, XIANG Rui^{1,2,3}, LI Yiyun^{1,2,3},

BAI aiqun^{1,2*}, WANG Guiping^{2,3}, JIA Aiying^{2,3*}

(1. Foshan University, Foshan, Guangdong 528231;

2. Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou, Guangdong 511400;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pig Breeding and Pig Disease Prevention and Control Technology Research Enterprise, Guangzhou, Guangdong 511400)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is one of the main pathogens causing viral diarrhea in pigs, causing huge economic losses to the pig industry in my country and even the world. Clinically, piglets within 7 days of age have the highest morbidity rate, and the case fatality rate can reach 100%. At present, vaccines are still an important means of preventing PEDV. This paper analyzes the reasons for the poor immune effect of traditional vaccines from the aspects of epidemiology, clinical symptoms and vaccine research status, and expounds the basic situation of PEDV and its immune prevention and control, so as to provide theoretical reference for the development of new vaccines.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea; Vaccine; Variation; Spike protein

猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是一种肠道嗜性病毒, 感染后的主要

症状为急性水样腹泻、呕吐、脱水等, 对仔猪群危害很大。自2010年冬季在我国大范围暴发的猪流

收稿日期:2022-01-05

基金项目:省级乡村振兴战略专项(200-2018-XMZC-0001-107-0145);广东省现代农业产业体系生猪创新团队(2021KJ126);番禺区创新创业领军团队项目(2017-R02-4);广东省科技计划项目(2020B1212070023)

作者简介:应碧云(1995-), 女, 贵州安顺人, 硕士研究生, 研究方向:动物疫病防控。E-mail:932955329@qq.com

*通信作者:白挨泉(1979-), 男, 山西吕梁人, 教授, 研究方向:猪传染病诊断与防治。E-mail:baiaiquan2008@163.com;贾爱卿(1979-), 女, 山东烟台人, 博士, 研究方向:预防兽医。E-mail:59492815@qq.com

行性腹泻疫情, PEDV 变异株逐渐成为我国流行的优势毒株, 目前防控猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 主要以 CV777 毒株为基础研发的灭活苗或减毒活疫苗为主。因为传统疫苗存在毒力返强、灭活不彻底等安全问题, 所以长期使用传统疫苗为 PEDV 在田间不断重组变异提供了有利条件, 致使其保护力逐年降低。如何开发一种高效、安全、低成本的新型疫苗成为领域内极受关注的问题。本文就 PED 的临床症状、流行病学发展和基因工程疫苗研究情况进行分析汇总, 为将来开发猪流行性腹泻新型疫苗奠定理论基础。

1 概况

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种以急性和高接触性为特点的肠道传染病。新生仔猪以急性水样腹泻、呕吐、脱水为主, 死亡率较高。本病主要以粪口传播为主, 气溶胶传播为辅, 感染猪只的粪便与呕吐物是主要传染源。PEDV 潜伏期较短, 一般 3 天左右, 危害程度与猪只年龄呈负相关。7 日龄内的仔猪感染后前期症状为呕吐, 随之出现水样腹泻, 粪便中可见未消化的小乳凝块, 颜色呈黄色或白色, 严重者带有血丝并伴有腥臭, 迅速脱水, 死亡率可达 100%; 3 周龄以上的猪发病后, 呈水样腹泻、体重减轻。保育猪与育肥猪感染后出现轻度腹泻、厌食, 部分猪只会出现发热症状, 一周内基本自愈。剖检可见胃部充盈有气体, 底部有溃疡, 内部有未被消化的食物乳凝块, 肠系膜血管呈树枝状充血坏死、肠黏膜脱落、肠管呈透明状并包裹着淡黄色水状内容物, 肛门有稀薄排泄物附着^[1-2]。近年来, 猪流行性腹泻的流行呈上升趋势, 已成为世界养猪业危害最严重的猪传染病之一。

2 流行病学

1971 年 PED 在世界上首次被英国报道, 发病猪只与猪传染性胃肠炎的症状非常相似, 但是实验室诊断却为阴性, 随后席卷了德国、法国、荷兰等欧洲国家^[3]。1978 年, 在比利时分离到一种类似冠状病毒的病原 CV777, 经致病性试验验证, 该分离病毒就是 PED 的病原。PEDV 在亚洲首次被

发现时流行情况甚至比当时的欧洲更加严重。其中, 以日本、韩国、泰国等国家 PED 疫情较为严重, 仔猪死亡率很高。我国从上世纪 80 年代开始, 陆续发现 PEDV 的感染情况, 但并不严重。2010 年 10 月份之前, PED 在我国呈地方性流行, 2010 年冬, 我国南方开始流行并迅速爆发扩散至全国, 死亡率和发病率高达 100%。根据 2012~2017 年全国各省市猪场收集的 1235 份样品的检测结果显示, 我国 PED 的阳性检出率为 80.1%, 10 月至次年 3 月阳性率较高, 大部分阳性样品来自广东、江苏、江西、湖北、安徽^[4]。PED 虽然在世界范围内均可发生, 但是其在亚洲与欧洲的发生情况有所差别。在欧洲, 猪流行性腹泻导致仔猪死亡的概率较低, 而在亚洲的死亡率较高。PEDV 首次在美国被报道是在 2013 年, 随后几个月的时间内扩散至全国, 整个猪群特别是对乳猪群造成了影响^[5-6]。PED 全年都可发生, 冬春季节发病率较高, 主要发病的是育肥猪和哺乳仔猪。带毒猪为主要传染源。感染了 PEDV 的猪只其排泄物带毒, 容易污染环境、饮水及器具, 造成循环感染。

有研究将美国生物信息中心上传的 405 个 PEDV 全基因组进行多重序列比对分析, 并构建了系统进化树。发现 PEDV 进化出两个独立的基因组: G I 群(经典毒株)和 G II 群(变异毒株)。G I 群进化成 G I -a 和 G I -b 两个亚群, 而 G II 群则分为 G II -a、G II -b、G II -c^[7]。G I -a 亚群主要包括了欧洲早期出现 CV777 和 SM98, G I -b 亚群多为来自中国和韩国的疫苗毒株(减毒 CV777 和 DR13)和其他流行毒株(AH-M、SD-M、SQ2014)。2010 年, PEDV 的变异株 G II -a 在世界范围内呈主要流行趋势, 重组分析结果显示 G II -a 亚群由美国的 AH2012、HuB1-2017、HuB7-2017 重组产生。G II -b 亚群由中国、韩国、泰国的毒株 AJ1102 和 CH/SD2014 为代表株。分析该系统进化树得出, PEDV G II 基因型出现了一个新的亚群 G II -c, 由来自美洲的(OH851)和欧洲的 S INDEL 毒株组成。追溯这些毒株的地理分布可发现, G I 基因型主要来自早期遭受 PEDV 威胁的地区, 如中国、韩国和欧洲; G II -a 亚群的毒株大部分来自美洲但仍有一小部分来自中国和日本; G II -b 亚群则是亚洲特有的毒株占比高; G II -c 亚群的毒株主要来自欧

洲,一部分来自中国和美国。通过对G I和G II的氨基酸序列进行分析,显示G II相较于G I有I116T、I356T、E365Q、T549S、G594S、N724S、A959V、S1044A、G1173D、S1232R、R1298Q共11个氨基酸的突变,可用于区分这两个亚群。G II-c亚群则是由G I-a和G II-a重组替换而来,即L67、A/S92、H/T113这三处氨基酸明显区别于其他亚群的分离株。

OKA等发现,PEDV变异毒株在纤突(S)蛋白基因发生插入或缺失,产生了7个氨基酸位点的突变(L521H、S523G、V527I、T549S、G594S、A605E、L612F),这些突变可能会引起S蛋白构象的变化,从而改变抗原性或免疫原性,这也可能是原始的弱毒疫苗和灭活苗无法起到良好免疫作用的主要原因^[8]。2013年,日本出现了高毒力PEDV,至2015年共报告1000次由高毒力PEDV引起的疫情^[9]。近年来,美国出现了两种PEDV的类型,一是原始高致病性PEDV,二是S-INDEL PEDV。这两种毒株导致美国爆发大规模疫情,直至2014年春季结束^[10]。

根据PEDV的S基因和M基因的遗传进化分析表明,当前,我国主要的流行毒株是变异毒株,属于G II群,同时还伴有G II-c亚群的重组毒株S-INDEL。而此前市场上的传统疫苗以经典毒株(G I群)为主,由此推测这是致使现有疫苗难以给机体提供有效免疫力的原因。

3 分子生物学特性

PEDV是一种有包膜的单股正链RNA病毒,大小约为28 kb,5'端有一个帽子结构和3'端包含多聚腺苷酸尾巴(poly A)结构,易发生变异,属甲型冠状病毒属的成员。病毒粒子形态不一,但都倾向于圆形,大小为95~190 nm,直径为130 nm。主要由7个开放阅读框(ORF)组成,分别为ORF1a、ORF1b、纤突(S)蛋白、ORF3、膜(M)蛋白、核衣壳(N)蛋白和膜(E)蛋白组成。

ORF1a、ORF1b位于基因组的N端,编码非结构蛋白1a和1b,对病毒复制和产生抗宿主的免疫力有重要的作用^[11]。S蛋白由1386个氨基酸组成,含有信号肽、中和表位、跨膜结构域和短细胞质结构域,可分为S1区(1~735aa)、S2区(736~1386aa)。S蛋白是PEDV基因组的主要结构蛋白,

负责病毒与受体的结合,还可以诱导中和抗体产生及介导病毒粒子与宿主细胞的融合。S基因序列间的差异性可用于区分不同PEDV毒株,也是影响病毒毒力和进化的主要因素^[12]。ORF3基因编码非结构辅助蛋白,对病毒的毒力和复制有较大的影响,高度保守,广泛应用于PEDV感染的诊断^[13-15]。E蛋白(76aa)是PEDV最小的结构蛋白—包膜蛋白,由76个氨基酸组成。E蛋白对病毒对出芽和组装起着重要作用,它决定着病毒的形态,并参与了病毒的复制过程。M蛋白(226aa)是三重跨膜结构膜糖蛋白,通常在被感染细胞的高尔基体内,由糖基化的N末端区,中间短的 α 螺旋区和病毒囊膜中C末端区三个结构组成^[16]。M蛋白在病毒粒子的组装、出芽过程中,可刺激机体发生免疫反应,并诱导产生 α -干扰素。其核苷酸序列与其他冠状病毒M蛋白的序列相比同源性较低,而在不同PEDV毒株之间是高度保守的,使M蛋白成为了检测PEDV特异性抗体和感染情况的候选蛋白。N蛋白(441aa),是磷酸化的核衣壳蛋白,在病毒感染初期表达量最高,能与病毒RNA结合,为螺旋核衣壳提供结构基础,也是与病毒复制和转录相关的碱性蛋白^[17]。具有保守性,还可以产生高水平的抗N蛋白抗体,基于以上的优点,N蛋白可以作为PEDV诊断的靶抗原。

4 疫苗现状

4.1 传统疫苗

PEDV是世界上危害最严重的猪病毒之一,采取疫苗防控是减少经济损失的主要手段。1999年,三个基于CV777的灭活和减毒双价活疫苗或三价疫苗在中国猪场投入使用,如由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的马思奇、佟有恩共同主持研究完成二联灭活苗和二联活疫苗的制备。该苗主要用于妊娠母猪的被动免疫以保护仔猪,也可以主动免疫不同年龄的猪^[18]。免疫期均为6个月,仔猪的被动免疫期是哺乳期至断奶后1周,二联灭活疫苗免疫后14 d可产生免疫保护^[19]。2015年韩国推出以基因型G II群为基础的减毒二价疫苗,使用了细胞培养的方法制备疫苗株,分别是KPEDV-9、SM98和DR-13^[20]。SM98已被肌肉注射用作活疫苗或灭活疫苗,而DR-13则是作为口服疫

苗的形式被生产。2004~2013年,韩国通过口服细胞培养减毒DR13株疫苗成功控制了当时爆发的PEDV疫情^[21-22]。目前,G II -b型PEDV在全世界的流行,一些动物疫苗制造商和研究人员正在努力开发基于G II -b的PEDV新型疫苗,在疫苗类型(灭活苗或弱毒苗),给药途径(肌肉注射或口服),或抗原型(全病毒或重组蛋白)等方面进行创新。G II -b全病毒灭活苗自2014年美国和2015年韩国的养猪场开始研发和使用,并用韩国分离株KNU-141113 S-DEL5/ORF3株生产G II -b口服活疫苗已在韩国获得批准,并从2020年起投入猪场开始试用^[23]。

由于造成猪流行性腹泻的病原,如猪传染性胃肠炎(TGEV)、猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)都是冠状病毒属成员,所以研究联苗是具有可行性的。我国现阶段常见的腹泻疫苗大多是二联苗,如猪传染性胃肠炎-猪流行腹泻二联灭活苗,其中PEDV疫苗株多为AJ1102株,也有部分使用SCSZ-1株作为疫苗株^[24]。在猪传染性胃肠炎-猪流行腹泻-猪轮状病毒三联苗中则多用弱毒CV777株。

近年来,人们发现疫苗的保护效力正在逐年降低。通过对PEDV的毒株进行鉴定检测发现PEDV经典株、变异株和疫苗株广泛存在于各个猪场之中,并且大部分猪场中PEDV变异株已经逐渐取代经典株成为优势毒株,这也就是为什么现有疫苗效力逐渐减低的原因^[25]。因此,新疫苗的研发迫在眉睫。

4.2 新型疫苗

目前,可供选择的新型疫苗形式有:病毒载体疫苗、细菌活载体疫苗、亚单位疫苗。

4.2.1 病毒载体疫苗

病毒载体疫苗即利用某种弱化的病毒来传递目的抗原或者靶基因,刺激机体发生免疫反应产生抗体^[26]。有研究表明,将外源基因锚定在杆状病毒表面进行表达,可以获得具有较高免疫原性的抗原^[27]。即将PEDV S蛋白及S1亚基分别与包膜糖蛋白GP64连接,获得重组杆状病毒后免疫小鼠和仔猪。数据分析发现,接种了全长S蛋白的仔猪在接受变异高毒力毒株攻击后,不论是临床症状还是血清中抗体的水平都显著优于接种S1亚基和对照组的猪只。在没有免疫佐剂的情况下,接

种全长S蛋白的猪只可以产生更高水平的中和抗体,这表明杆状病毒可以作为蛋白质疫苗的佐剂,以刺激T、B细胞活化,调控白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF- α)来刺激天然免疫应答,也为其他冠状病毒在杆状病毒表面表达提供了可能。

目前用于研究的病毒载体主要是杆状病毒、痘病毒、水泡口炎病毒等。病毒载体疫苗的优点在于可以插入多个抗原靶基因进行表达,生产成本低,已经成为兽用疫苗研制与开发的重要方向。

4.2.2 细菌活载体疫苗

乳酸菌口服活载体疫苗是利用乳酸菌(LAB)是对胃肠道有益处,促进它成为口服疫苗的候选者^[28]。有研究人员采用干酪乳杆菌表达PEDV S蛋白的抗原表位(COE)区和M细胞(肠微褶皱细胞)靶向多肽co1与COE的重组蛋白分别接种小鼠,结果显示,口服免疫co1与COE重组蛋白的小鼠可以诱导更强的抗PEDV血清IgG和粘膜免疫SIgA抗体反应,而添加了co1的重组蛋白比单独COE蛋白更有效的诱导脾细胞增殖和Th2型细胞免疫应答^[29]。

但是由于消化系统的特殊性,在胃肠道内抗原的降解该如何解决,肠上皮细胞向肠淋巴组织运输效率低等,都预示着疫苗的包装方式会成为一个极受关注的问题。因为疫苗在消化道的哪个部位被释放与疫苗效力的强弱息息相关。

4.2.3 亚单位疫苗

亚单位疫苗是指通过化学或生物学方法调取细菌或病毒的特殊结构蛋白,并筛选出具有免疫活性的片段制备成疫苗。其优点是可以避免机体产生无关抗原诱发的抗体进而减少疫苗的副作用。

S蛋白作为PEDV重要的结构蛋白,其表面有PEDV重要的抗原决定簇,具有良好的免疫原性,在机体抗原免疫反应中起重要作用。有研究表明,初乳和母乳中中和抗体活性与S蛋白IgA的抗体水平相关,S蛋白携带了B淋巴细胞抗原表位,B细胞表面上的决定簇由抗原表面的亲水性氨基酸组成,这些使S蛋白可以轻易接近B细胞受体并让抗体分子识别,诱导机体产生中和抗体^[30]。此外,用S蛋白免疫怀孕母猪后,其哺乳仔猪可以通过母乳获得针对PEDV的被动体液免疫^[31]。S基因的第499~638aa区是核心中和表位区,能够介导

PEDV 和宿主受体结合并产生中和抗体,被认为是制备 PED 亚单位疫苗的主要靶抗原^[32]。

与传统疫苗相比,亚单位疫苗具有低成本、高产量、安全性好、易制备等优点。但是亚单位疫苗免疫力的维持时间短、免疫原性较弱。未来,我们可以考虑添加合适的疫苗佐剂以延长疫苗保护时间来促进新型亚单位疫苗的发展。Li 等人开发出一种以细菌鞭毛蛋白为免疫佐剂的新型亚单位疫苗,试验对比了 PEDV COE 蛋白和以 rSF 鞭毛蛋白作为免疫佐剂的重组 COE 蛋白对仔猪进行接种,以无菌 PBS 溶液做对照组,在后海穴注射,在免疫 21d 后对各组猪只进行 PEDV 强毒变异株攻毒试验,检测 IgG 和 IgA 水平以及粪便中排出病毒的情况^[33]。结果显示,接种了以鞭毛蛋白为佐剂的重组蛋白亚单位疫苗各项检测结果均优于其他两组,且在十二指肠的镜检结果中可见肠道绒毛仅有轻微的萎缩,这些结果都为研制有关猪腹泻病新型疫苗提供了新的思路。新型佐剂方面,IgG 抗体的重链区有一段基因被称为 Fc,而 Fc 具有良好的免疫佐剂作用,例如 Fc 可以与上皮细胞和造血细胞表面的 Fc 受体结合,负责抗体运输的同时还能延长抗体在血清中的半衰期;诱导抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP),抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)以及补体依赖的细胞毒作用(CDC)^[34-35]。Li 等人在 CHO-S 细胞中成功表达出,古典猪瘟病毒(CSFV)E2 蛋白与 Fc 融合的重组蛋白,并作为新型亚单位疫苗来评估各项指标^[36]。表明该重组蛋白可以与抗原呈递细胞(APC)上的 Fc γ RI 结合,并显著增加血清和粪便中的 IgA 水平,从而增强粘膜免疫应答,除此之外,E2 和 Fc 的重组蛋白还可以增强 CSFV 特异性 T 细胞免疫应答,具有 Th1 样细胞因子分泌模式,显著刺激了 Th1 偏向性细胞免疫应答和体液免疫应答。以上都表明 Fc 作为疫苗佐剂对不仅保留了功能蛋白的生物活性,还可以使蛋白具有一定的抗体性质。

表达重组蛋白有原核表达与真核表达两种方式,真核表达系统可以适当修饰表达产物,常见的系统有酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统、杆状病毒表达系统等。杆状病毒表达系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)的优点是:具有翻译后修饰蛋白的功能,可容纳较大的

基因片段,且仅对特定的昆虫细胞有感染性,对动植物无致病性;表达高质量的重组蛋白,且杆状病毒昆虫细胞表达系统早在人医领域被广泛应用,例如人乳头瘤病毒(HPV)疫苗;同时基因工程载体疫苗在兽用疫苗领域也被广泛应用,如禽流感疫苗、牛副流感疫苗,在生物医学范畴中有巨大的应用前景^[37]。

5 小结

目前, PED 在仍全球范围内流行,对世界养猪业的影响也越来越大。究其原因是没有高效的疫苗和针对性药物,因其 S 蛋白的易突变性,由经典毒株制备的传统疫苗无法取得较好成效,因此了解认识 PED 是刻不容缓的。随着生物技术的不断发展,对 PEDV 的各项研究也在逐步深入,制备高效安全、价格低廉的疫苗是每位研究学者努力的方向。

参考文献:

- [1] 赵海忠, 李良华, 宋忠旭, 等. 一起猪流行性腹泻临床防控案例分析[J]. 养猪, 2020, (3):113-115.
- [2] 杨朋霞, 闫若潜, 王华俊, 等. 基于猪流行性腹泻病毒 N 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立及初步应用[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(10):1021-1026.
- [3] WOOD E N. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea[J]. Veterinary Record, 1977, 100(12):243-244.
- [4] WEN Z, LI J, ZHANG Y, et al. Genetic epidemiology of porcine epidemic diarrhoea virus circulating in China in 2012-2017 based on spike gene [J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2018, 65:883-889.
- [5] STEVENSON G W, HAI H, SCHWARTZ K J, et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 2013, 25(5):649-654.
- [6] CIMA G. Fighting a deadly pig disease Industry, veterinarians trying to contain PED virus, new to the US [J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2013, 243(4):469-470.
- [7] GUO J, FANG L, X YE, et al. Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. Wiley-Blackwell Online Open, 2018, 66(1):111-118.
- [8] OKA T, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine

- epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 173(3-4):258-269.
- [9] MASUDA T, MURAKAMI S, TAKAHASHI O, et al. New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(10):2565-2572.
- [10] JARVIS M C, LAM H C, ZHANG Y, et al. Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 123:175-184.
- [11] KOCHERHANS R, BRIDGEN A, ACKERMANN M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence [J]. *Virus Genes*, 2001, 23(2):137-144.
- [12] LI W, LI H, LIU Y, et al. New Variants of Porcine Epidemic Diarrhea Virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(8):1350.
- [13] WANG E, GUO D, LI C, et al. Molecular Characterization of the ORF3 and S1 Genes of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Non S-INDEL Strains in Seven Regions of China, 2015 [J]. *Plos one*, 2016, 11(8):e0160561.
- [14] DIEP N V, NORIMINE J, SUEYOSHI M, et al. Novel Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Variants with Large Deletions in the Spike (S) Gene Coexist with PEDV Strains Possessing an Intact S Gene in Domestic Pigs in Japan; A New Disease Situation [J]. *Plos One*, 2017, 12(1):e0170126.
- [15] YF, LIU, YC, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus in central China based on the ORF3 gene and the S1 gene [J]. *Virology Journal*, 2016, 2016, 13(1):192.
- [16] 赵洪君, 王宝东, 周洪伟. 浅析猪流行性腹泻病毒的蛋白结构和诊断方法 [J]. *山东畜牧兽医*, 2020, 41(7):65-67.
- [17] NGUYEN V P, HOGUE B G. Protein interactions during coronavirus assembly [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(12):9278.
- [18] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联弱毒疫苗的研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 1999(6):3-5.
- [19] 刘佳. PEDV 变异株的分子流行病学调查及三种毒株双重 RT-PCR 鉴别检测方法的建立 [D]. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- [20] LV C, XIAO Y, LI X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus: current insights [J]. *Virus Adaptation and Treatment*, 2016, 8:1-12.
- [21] PARK S J, SONG D S, PARK B K. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(7):1533-1541.
- [22] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. *Virus Genes*, 2012, 44(2):167-175.
- [23] WON H, LIM J, YUN H N, et al. Efficacy of Porcine Epidemic Diarrhea Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *Vaccines*, 2020, 8(4):642.
- [24] 程杰, 栾慧, 吴家强, 等. 猪流行性腹泻新型疫苗的研究进展 [J]. *养猪*, 2015(4):97-101.
- [25] XIE C, ZHUO H A, SUN W, et al. Construction and immunological evaluation of recombinant adenovirus vaccines co-expressing GP3 and GP5 of EU-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81(12):1879-1886.
- [26] 赵德, 李鹏, 高凤山, 等. 猪流行性腹泻病毒乳酸菌载体疫苗对小鼠初步免疫试验 [J]. *动物医学进展*, 2013, 34(3):6-9.
- [27] CHANG C Y, HSU W T, CHAO Y C, et al. Display of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein on Baculovirus to Improve Immunogenicity and Protective Efficacy [J]. *Viruses*, 2018, 10(7):346.
- [28] SONG Q, STONE S, DREBES D, et al. Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions [J]. *Virus Research*, 2016:85-92.
- [29] WANG X N, WANG L, ZHENG D Z, et al. Oral immunization with a *Lactobacillus casei*-based anti-porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) vaccine expressing microfold cell-targeting peptide CoI fused with the COE antigen of PEDV [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(2):368-378.
- [30] OH J, LEE K W, CHOI H W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(11):2977-2987.
- [31] ZHANG Y, YAO Y, GAO X, et al. Development of a Neutralizing Monoclonal Antibody Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus S1 Protein [J]. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis & Immunotherapy*, 2016, 35(1):37-40.
- [32] CRUZ D, KIM C J, SHIN H J. Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes [J]. *Virology*, 2006, 354(1):28-34.
- [33] LI Q, XU Z, WU T, et al. A flagellin-adjuvanted PED subunit vaccine improved protective efficiency against PEDV variant challenge in pigs [J]. *Vaccine*, 2018, 36(29):4228-4235.
- [34] 刘泽辉. 表面展示猪不同亚型 IgG Fc 的重组杆状病毒疫苗载体研究 [D]. 硕士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- [35] SANJUKTA C, COLIN B, RUPINDER K, et al. Studies to Prevent Degradation of Recombinant Fc-Fusion Protein Expressed in Mammalian Cell Line and Protein Characterization [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(6):913.
- [36] LI J, LI X, MA H, et al. Efficient mucosal vaccination of a novel classical swine fever virus E2-Fc fusion protein mediated by neonatal Fc receptor [J]. *Vaccine*, 2020, 38(29):4574-4583.
- [37] 郭思杰, 刘俊琦, 李玉娟, 等. 猪流行性腹泻及新型疫苗研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(9):2935-294.

水葫芦饲料资源化研究进展

凌欣华¹, 刘兴隆¹, 钟雄声¹, 徐国宝^{1*}, 涂轲¹, 翁茁先², 姚雪军³

(1. 梅州市农林科学院动物科学研究所, 广东 梅州 514021;

2. 湖南农业大学动物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128;

3. 平远县农业农村局, 广东 梅州 514600)

摘要:水葫芦营养成分丰富, 具有作为非粮饲料的潜力, 但根据其自身缺点水葫芦并不容易开发利用。针对水葫芦自身缺点进行相应的加工可对其充分开发利用, 缓解我国粮食紧缺, 促进畜牧业的发展。本文从水葫芦的常规养分、作为饲料所面临的问题、加工方法和动物饲喂效果四个方面进行综述。

关键词: 凤眼莲; 饲料资源; 养分; 加工; 饲喂效果

中图分类号: S816 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)05-0041-05

Progress in Utilization of Eichhornia Crassipes as Feed Resource

LING Xinhua¹, LIU Xinglong¹, ZHONG shengxiang¹, XU Guobao¹, TU Ke¹, WENG Zhuoxian², YAO Xuejun³
(1. Institute of Animal Science, Meizhou Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Meizhou Guangdong 514021;

2. College of Animal Science & Technology, Hunan Agriculture University, Changsha Hunan 410128;

3. Agricultural and rural Administration of Pingyuan County, Meizhou Guangdong 514600)

Abstract: Eichhornia crassipes was rich in nutrients and has potential to be used as a non-grain feed. However, according to its own shortcomings, eichhornia crassipes was not easy to develop and utilize. The eichhornia crassipes can be fully developed and utilized by corresponding procession according to its own shortcoming, so as to alleviate the food shortage in China, and promote the development of animal husbandry. In this paper, the conventional nutrients of eichhornia crassipes', the problems to be faced as the feed resource, the processing methods and the animal feeding effects of animals were reviewed.

Keywords: Eichhornia crassipes; Feed resource; Nutrient; Processing; Feeding effect

水葫芦, 又名凤眼莲, 雨久花科、凤眼蓝属, 多年生水生草本植物, 原产于南美洲。由于其生长速度快, 容易形成单一的优势群落, 影响其他水生生物的生长, 造成生态的破坏。1901年, 我国引入水葫芦作饲料用途, 但是诸多原因导致其并未广泛推广利用, 反而在我国南方大面积污染水

体。饲料是畜牧业发展的重要保证, 常规模式下, 提高畜牧产品量必然会消耗大量的粮食, 而水葫芦生长快、营养成分丰富, 具有成为畜牧饲料的潜力。寻找合适的加工方式可以使其“变废为宝”, 开发水葫芦等非常规饲料可以改善畜牧业的饲料结构, 起到推动畜牧业发展的作用。本文将从水

收稿日期: 2022-02-25

作者简介: 凌欣华(1970-), 大专, 兽医师, 广东梅州平远人, 主要从事微生态制剂、兽医临床等应用研究。E-mail: mzpylxh@163.com

*通讯作者: 徐国宝(1988-), 本科, 兽医师, 广东梅州市人, 主要从事畜禽品种引进推广、动物疫病防控等。E-mail: 491212766@qq.com

葫芦的营养成分、作为饲料资源所面临的问题、加工方式和在养殖试验中的饲喂效果进行综述。

1 水葫芦常规饲料营养成分

众多国内外学者对水葫芦进行了营养成分测定(表1),证明其营养成分丰富,富含钾、钙、磷、铁、镁等元素及多种氨基酸。同时,粗蛋白、粗脂肪及粗纤维的含量也比较高。据滇池生态研究所报道,滇池外海每吨新鲜水葫芦平均含氮1.30 kg,含磷0.43 kg。新鲜水葫芦的叶茎中,脂肪约为0.1%,脂肪含量与大白菜相同;蛋白质含量约为1.3%,与大白菜的1.4%接近;总糖的含量约为0.8%,与大白菜的0.9%相近^[1]。还有研究对水葫芦根系分泌物成分进行分析,结果表明该分泌物中含有20种氨基酸^[2]。由表1可以看出,水葫芦全株蛋白质均处在较高水平(10.4%~20.0%)、同时钙、磷含量也较高,还含有大量其他元素,较稻草、秸秆等粗饲料而言,作为饲料使用品质更优,与羊草相当,但不及苜蓿草等优质牧草,经加工调制后,有成为中等牧草营养水平的潜力。

表1 水葫芦的营养成分(% ,干物质基础)

营养成分	茎、叶 ^[3]	茎、叶 ^[4]	根 ^[5]	全株 ^[6]	全株 ^[7]	全株 ^[8]
有机物	-	74.3	-	83.61	-	-
粗蛋白	18.31	20	10.4	16.25	14.5	12.07
粗脂肪	1.51	3.47	0.98	1.61	-	1.72
粗纤维	-	18.9	29.2	16.34	-	-
无氮浸出物	-	31.9	-	49.41	-	-
半纤维素	24.15	33.4	-	18.42	-	-
纤维素	22.04	19.5	-	25.61	-	-
木质素	11.05	9.27	-	9.93	-	-
灰分	21.34	25.7	18.2	16.39	15.9	15.53
磷	0.46	0.53	0.21	0.53	0.38	0.29
氮	2.93	-	-	2.76	-	-
镁	0.16	0.17	0.31	-	0.31	0.48
钙	-	0.58	0.81	2.29	3.2	1.78
钾	3.88	-	1.36	2.44	3.3	5.38

2 水葫芦作为饲料资源所面临的问题

2.1 金属元素富集

水葫芦对各种金属元素具有很强的富集作

用,根部富集作用比茎叶更强,高3倍左右。水葫芦不仅能富集对氮、磷、钾、钙等多种无机元素^[8]。还能吸附镉、锌、铬、铅、砷、汞、氟等重金属元素^[9-11]。除重金属外,水葫芦对稀土元素也有较强的富集作用。在高稀土元素水体中,水葫芦体内富集的稀土元素可通过动物饲料进入食物链,可能会影响人和动物健康。当前我国水体污染严重,以工业区生长的水葫芦为原料加工的饲料,可能会影响动物健康及畜牧产品安全性。

钙、磷、铁、锌等是动物饲料常规添加营养素,水葫芦对这些元素的富集是有利的。而关于重金属元素,饲料卫生标准(GB/T 13078-2011)规定了常规饲料中镉、铬、铅、砷、汞、氟等元素的最高限量。有研究对水葫芦植株各种重金属元素的含量进行测定,表明水葫芦各部位镉、铅、铬、砷和氟等元素含量均在上述标准允许剂量之内,只有根部的汞含量超标^[13]。邬苏晓也曾报道,水葫芦中各种重金属含量分别为砷1.07 mg/kg、铅0.86 mg/kg、镉0.13 mg/kg、汞0.2 mg/kg、铬0.01 mg/kg,均在我国饲料卫生标准规定允许量之内^[12]。

2.2 携带寄生虫

水葫芦富含多种营养成分,有“经典饲料”之美誉,但不作加工直接饲喂家畜可能会使其感染各种寄生虫,如蛔虫、吸虫等,给养殖户造成偿失。

2.3 含水量高

水葫芦植株体内含水量高达90%,易腐败,且粗纤维含量高、纤维较短,口感较差,不宜直接用作饲料,且水分过高也不利于青贮等加工。

3 水葫芦用作饲料的加工方式

水葫芦具有作为饲料资源的潜力,但由于其自身缺陷制约并未广泛利用。我们应针对其缺点对其进行相应的加工,以改善水葫芦饲料化利用现状。其主要加工方式有脱水、青贮、提取叶蛋白等。

3.1 脱水

3.1.1 脱水方法

由于植株含水量太高,脱水处理是水葫芦后续无害化利用、资源化的关键^[17]。水葫芦主要分布在在我国南方,其适宜收获季节又正是多雨季节,在堆放过程中易腐烂,营养物质流失严重。如

果采用传统的风干、自然晾晒的方式,容易受到天气、场所的制约,处理不当很容易腐败变质。所以推荐采用机械脱水,产生的废水便于收集,减少二次污染,而且机械占地小、效率高、处理更及时。国内外学者都有设计相关设备,Akendo等研究设计的烘干设备可以将水葫芦含水率降至91%,但是成本昂贵,难以推广^[18]。杜静等设计的脱水设施采用螺旋挤压方式进行脱水,脱水效果良好(水葫芦渣含水率为86.23%),但单机日处理能力较低,不能大规模进行水葫芦脱水处理,也不适宜推广^[19]。王岩将辊轮式压榨机应用于水葫芦脱水,反复挤压3次,水葫芦渣的含水量降低至65%~68%,效果优于前人的研究,是目前最合适的机械脱水装备^[20]。水葫芦经脱水处理后水分含量下降,且养分也有一定损失,但仍能保持较高的营养水平。由于水葫芦的保存、青贮等对含水量都有一定的要求,所以机械脱水的研究为水葫芦作为饲料资源利用解决了一个前期问题。

3.1.2 脱水的作用

利用水葫芦作为饲料资源时一般先对其进行脱水处理,或将其干燥后碾制成粉。另一种应用途径是开发微生物饲料产品,利用固体发酵技术和微生物工程,可以开发出营养价值高、口味佳的水葫芦饲料产品。经过一定程度的脱水处理,可以有效的解决其含水量高、易腐烂的缺点。

3.2 青贮

青贮,是水葫芦综合利用的一个有效途径,但其生物学特性决定了它并不是很理想的青贮饲料原料。一方面,青贮适宜的水分含量在65%~70%,而水葫芦植株体内含水量高达90%,并不适宜直接青贮;同时,乳酸菌发酵在青贮过程中起到很大作用,而水葫芦中可溶性碳水化合物含量不高,会导致青贮过程发酵底物不足,降低乳酸的产生速度,青贮不易成功^[21]。因此,水葫芦青贮过程中应先对其进行脱水处理再青贮,且一般不单独青贮,多采用混合青贮的方式。青贮时须添加甲酸、糖或乳酸菌等来辅助发酵,保证青贮成功。

3.2.1 青贮方法

青贮手段包括调干物质、调糖、调酸。水葫芦水分高、干物质含量低,可通过挤压的方式来调整水葫芦干物质含量,以达到较好青贮效果,同时能

提高水葫芦在复合青贮的使用比例。通过补充稻草、醋糟、麦麸到达青贮合适的水分含量,可达到较好青贮效果^[22]。陈鑫珠等实验表明水葫芦与玉米秸秆混合青贮中绿汁发酵液和纤维素酶的混合添加,效果显著^[23]。玉米秸秆混合比例为5:5时的青贮品质效果最佳。甲酸有防腐作用,是饲料青贮的理想添加剂,青贮原料的DM和WSC含量较低时,添加高水平甲酸(7 mL/kg)青贮料的自然发酵有抑制作用,有防腐效果,使养分更好保存,是应用于水葫芦青贮的最佳选择之一^[24]。青贮发酵过程中水溶性糖为乳酸菌发酵的有效能源,水葫芦水溶性糖含量不高,所以添加水溶性糖是其调制优质青贮饲料的必要条件。邬苏晓研究表明,玉米粉和蔗糖可为发酵提供水溶性糖,且能够平衡pH值、抑制其他微生物生长,提高青贮发酵的品质^[12]。按水葫芦80%、玉米粉10%、豆粕粉5%、菌种5%的比例混合均匀并结合实际控制含水量。发酵后得水葫芦粗蛋白质、粗纤维含量均有变化,其中粗蛋白含量提高了160.83%、粗纤维含量降低了56.5%。经过发酵之后的水葫芦不仅蛋白质含量增加,且适口性得到改善,可有效代替部分蛋白质饲料作为全价饲料原料。庄益芬等在青贮过程中分别添加了甲酸、绿汁发酵液、四蚁酸铵、蔗糖、绿汁发酵液+蔗糖,对青贮品质进行对比分析显示,这些添加剂均有改善青贮饲料品质的作用,其中最优选为添加绿汁发酵液+蔗糖^[24]。青贮是开发水葫芦用作饲料资源的最优途径,通过添加剂和特殊青贮工艺的使用,可改善水葫芦不适宜青贮的状况,使水葫芦变得适合青贮。

3.2.2 青贮的作用

水葫芦通过青贮厌氧发酵后,能够有效杀灭水葫芦中的寄生虫、虫卵及有害致病微生物,同时改善适口性。另一方面,用作青贮的水葫芦,不能采用重工业污染区周围生长的植株,可以考虑去除其根部再进行加工青贮,并实时监测水体重金属浓度与水葫芦植株各部位重金属含量,为水葫芦饲料资源化提供参考,这样可以一定程度上减少青贮水葫芦中重金属含量。

3.3 叶蛋白提取

水葫芦叶蛋白中氨基酸种类齐全、比例适当,其必需氨基酸平衡性与鸡蛋蛋白相当,优于谷类

蛋白,且富含钙、磷、镁、铁、锌等元素及胡萝卜素与叶黄素^[15],非常适合用作动物饲料蛋白源^[25]。叶蛋白的提取作为利用水葫芦的一种手段也被研究者大量研究。通常提取叶蛋白的方法步骤如下:(1)碎草;(2)打浆榨汁;(3)沉淀浓缩叶蛋白;(4)制备蛋白膏;(5)干燥获得成品,沉淀浓缩叶蛋白阶段最为关键步骤。影响水葫芦叶蛋白提取率的两个主要因素为pH值和温度,酸性条件有利于叶蛋白的提取,而温度和蛋白质的热变性有关;高温会导致蛋白质变性凝固。

3.3.1 叶蛋白提取方法

吕富研究认为,提取叶蛋白方法效果加热法最佳、氯化钙絮凝、葡萄糖酸内酯絮凝和直接发酵法次之^[26]。70~80℃是提取水葫芦叶蛋白最佳温度;氯化钙最佳添加量为0.2%;葡萄糖酸内酯絮凝最佳添加量0.1%、直接发酵法最佳发酵时间为24~48小时。谢瞰等研究指出,水葫芦最佳提取工艺为:絮凝温度80℃、pH值3.0、加盐量2.0%、料水比1:2,此时得到水葫芦叶蛋白中粗蛋白达到43.69%,提取率为14.55%;影响水葫芦叶蛋白提取率效果的因素为絮凝温度>pH值>加盐量>料水比^[14]。Medeiros等在温度为80℃,pH为3.7的条件下,用NaOH溶液进行提取打碎后的水葫芦茎的叶蛋白,料液比为1:3,得到粗蛋白含量为36.78%的浓缩蛋白^[27]。叶蛋白提取能使水葫芦“变废为宝”,为畜牧业提供大量饲料蛋白,同时减少水葫芦对湿地的破坏。

3.3.2 叶蛋白提取的作用

从水葫芦叶中提取蛋白用作动物饲料蛋白原,不但可以有效解决水葫芦重金属富集问题,同时也可避免家畜因直接食用水葫芦而感染寄生虫。

4 水葫芦饲喂动物及效果

4.1 饲喂水产动物效果

水葫芦是一种很好的水产动物饲料。水葫芦蛋白质可分解成多种氨基酸,除了蛋氨酸和色氨酸,其它的必需氨基酸含量均达到配合鱼饲料标准,而水葫芦叶蛋白浓缩粉也可作为水产养殖的一种原料^[25]。草鱼肠道中具有纤维素酶,使其容易消化水葫芦中有效成分,所以水葫芦常作为草鱼的补充粗饲料。有研究指出,发酵后的水葫芦

作为鲤鱼幼苗的饲料,存活率(14.3%)与对照组(5.0%)相比有极显著提高($P < 0.01$)^[2]。江苏娄封水产养殖场连续13年用水葫芦作为青绿饲料,年均鱼产量15 t/hm²以上。11.9 t水葫芦加上430 kg配合饲料,可生产1 t鱼,其中草食性鱼类占36.6%,鱼的增重达4.92倍^[28]。王维新研究指出,以30%的比例水葫芦替代马尾藻、鼠尾藻发酵后饲喂刺参效果良好^[29]。这很大程度降低了刺参的饲养成本,也保护了马尾藻、鼠尾藻这一海洋资源,有利于保护海洋生态平衡。

4.2 水葫芦饲喂反刍动物的效果

反刍动物具有强大的瘤胃功能,其日粮对纤维素有一定的要求,而水葫芦的纤维含量较高,所以由水葫芦特别适宜加工成反刍动物饲料。水葫芦饲料资源化的关键之一是合理控制水葫芦的添加比例,由于反刍动物瘤胃功能强大,其饲料中添加水葫芦比例可达到30%。纪苗苗曾报道,水葫芦添加尿素、甜菜粕进行青贮,所得饲料与羊草一起饲喂湖羊,效果良好^[30]。白云峰等研究表明,水葫芦复合青贮饲喂山羊效果良好,采食量为每天2152.5 g,平均日增重为122.0 g,饲料转化率为6.6^[31]。添加30%的水葫芦渣混合青贮料添加到山羊全价饲料中,对山羊生长性能及肉质安全没有负面影响^[32]。Vasconcelos等实验指出,在绵羊日粮中添加水葫芦对其血浆中尿素、葡萄糖、AST和GGT的浓度无影响,虽然减少了营养摄入和消化率,但用水葫芦替代部分全价饲料,具有一定的经济优势^[33]。

4.3 水葫芦饲喂家禽效果

水葫芦饲喂水禽,不但可以节约成本,还可以形成“水体修复-水禽养殖-污水处理”水牧循环生态体系,在节约成本的同时,保护当地生态环境。水葫芦饲喂水禽时添加比例可达20%;而肉鸡生理结构与水禽不同,其饲料水葫芦干粉的添加量最多为7%。鹅的饲粮中粗纤维的要求较高,水葫芦能提供提供了鹅饲料粮中必要的纤维量。鹅对水葫芦青贮饲料表现为喜食、采食量大。水葫芦青贮加工后,可成为鹅养殖业中纤维饲料的来源,能大幅降低养鹅饲料成本^[34]。在饲料中添加水葫芦能提高扬州鹅生长性能,但降低了屠宰性能,同时也减少了脂肪的沉积^[35]。在某养鸭场建立的“鸭粪尿排

放-人工湿地-凤眼莲净化水体-水葫芦喂鸭-鸭粪尿排放”循环体系中,利用湿地上种植水葫芦起到净化鸭场养殖粪尿污水的作用。放养水葫芦后,养殖水域化学需氧量降低64.44%、总氮去除21.78%、总磷去除23.02%,水体溶氧和透明度显著提高^[36]。杨海等研究结果表明,水葫芦饲养麻鸭的最佳配比约为20%,饲喂期8周内,总采食量达到34096 g,增重量达到10728 g,饲料报酬为33.8%,屠宰率为65.6%^[37]。有研究报道,将3.0%~7.0%水葫芦干粉添加到肉鸡日粮,不会影响肉鸡的采食量、日增重、饲料利用率及屠宰性能等指标^[38]。

4.4 水葫芦饲喂猪效果

水葫芦作为猪饲料可以鲜喂、晒干后饲喂或青贮后饲喂。饲喂鲜水葫芦每头猪每天以5~10 kg为宜,晒干后饲喂应低于饲料干重的10%。有研究指出,在肥育猪饲料中适量添加水葫芦替代部分糠麸饲料可以降低饲料成本,提高经济效益,且不会对猪的增重、血象、采食量以及屠宰指标造成不良影响^[39]。另有研究报道,对于肥育猪日粮中添加5.0%~15.0%水葫芦,不影响猪的日增重和采食量,与对照组相比,屠宰率、背膘厚、眼肌面积等差异不显著^[40]。

5 小结与展望

水葫芦营养成分丰富,非常适合作为非粮饲料。但水葫芦具有一些自身的局限性,存在如含水量太高、重金属富集、寄生虫等问题,我们可以用相应的加工方法来解决这些问题,如机械脱水、复合青贮、提取叶蛋白等。水葫芦制作饲料在增加饲料来源的同时,减少了养殖行业的成本,同时还有利于环境的保护,一举多得。所以我们应该创造条件多加工利用水葫芦,推动水葫芦饲料资源化。

参考文献:

- [1] 陈瑛,金叶飞,王秀琴,等.水葫芦各部位富集能力的研究[J].环境保护科学,2004,30(3):31-34.
- [2] SAHU A K, SAHOO S K, GIRI S S. Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of Indian major carp, *Labeo rohita* [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 85(3): 309-311.
- [3] 徐广平,沈育伊,何成新,等.桂林会仙岩溶湿地不同富营养

- 化水体水葫芦营养成分研究[J].中国农学通报,2012,28(26):262-266.
- [4] ABDELHAMID A M, GABR A A. Evaluation of water hyacinth as feed for ruminants[J]. 1991, (7): 745-756.
- [5] 余有成.水葫芦的营养成分及青贮方法[J].国外畜牧学:饲料,1989,(1):38-41.
- [6] PODDAR K, MANDAL L, BANERJEE G C. Studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) - Chemical composition of the plant and water from different habitats [J]. *Indian Veterinary Journal*, 1991, 68(9): 833-837.
- [7] 白云峰,周卫星,张志勇,等.凤眼莲的饲料资源化利用[J].家畜生态学报,2009,30(4):103-105.
- [8] 周文兵,谭良峰,刘大会,等.凤眼莲及其资源化利用研究进展[J].华中农业大学学报,2005,24(4):423-428.
- [9] 陈文萍,徐舒阳,那中元,等.紫根水葫芦对重金属水体的净化作用[J].环境工程学报,2016,10(5):2284-2290.
- [10] 王凤珍,宋新娟,徐俊辉,等.墨水湖湖滨带水生植物重金属富集能力研究[J].武汉理工大学学报,2014,36(11):114-118.
- [11] NEWETE S W, ERASMUS B F N, Weiersbye I M, et al. Sequestration of precious and pollutant metals in biomass of cultured water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(20): 20805-20818.
- [12] 邬苏晓.益生菌发酵凤眼莲生产蛋白质饲料的初步研究[J].饲料工业,2016,37(4):54-55.
- [13] 李菊娣.凤眼莲的营养性评定与优化利用研究[D].浙江大学,2006.
- [14] 谢瞰,李梦婕,熊春梅,等.水葫芦叶蛋白提取工艺优化研究[J].天然产物研究与开发,2016,(3):462-466.
- [15] ALETOR O, OSHODI A A, IPINMOROTI K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(1): 63-68.
- [16] ZHANG Y, SHEN Y, ZHANG H, et al. Isolation, purification and identification of two antioxidant peptides from water hyacinth leaf protein hydrolysates (WHLPH) [J]. *European Food Research & Technology*, 2017: 1-14.
- [17] 王云英,周洪文,彭慧,等.水葫芦污水治理及资源化利用研究进展[J].江苏农业科学,2012,40(7):313-317.
- [18] 杜静,钱玉婷,靳红梅,等.水葫芦规模化脱水作业前粉碎预处理方案中试必选[J].农业工程学报,2017,8(15):266-267.
- [19] 杜静,常志州,叶小梅,等.水葫芦粉碎程度对脱水效果影响的中试[J].农业工程学报,2012,28(5):207-212.
- [20] 王岩,张志勇,张迎颖,等.一种新型水葫芦脱水方式的探索[J].江苏农业科学,2013,41(10):286-288.
- [21] 王成章,王恬.饲料学 动物科学专业用[M].中国农业出版社,2003.
- [22] OELKER E R, REVENEAU C, FIRKINS J L. Interaction of

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.09

肉种鸡核心群禽白血病净化实践报告

蔡曼珊, 严霞, 计坚*

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

摘要:禽白血病是由反转录病毒科禽反转录病毒属成员引起的各种可传播的良性和恶性肿瘤的总称。其中, 鸡的外源性禽白血病病毒包括A、B、C、D、J和K亚群, 有一定的致病性。从20世纪90年代以来该病给我国养殖业造成重大的经济损失。禽白血病病毒主要通过感染的鸡胚从母鸡垂直传染给下一代, 因此, 做好核心群的禽白血病净化, 阻断垂直传播是禽白血病防控的关键。本研究对2个接近实现净化的核心鸡群及其后代通过病毒分离、蛋清检测、病理切片等不同方法进行禽白血病监测。从监测结果看, 不同代次核心群的外源性禽白血病病毒阳性率极低, 甚至为0; 在核心群基本实现净化的条件下, 后代鸡群可保持极低的阳性率。

关键词: 禽白血病; 核心群; 净化

中图分类号:S852.65+7 文献标识码:B 文章编码:1005-8567(2022)05-0046-04

Report on ALV Eradication Practice in Nucleus Flocks of Chicken Breeds

CAI Manshan, YAN Xia, JI Jian*

(Institute of Animal Science, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou Guangdong 510640)

Abstract: Avian leukosis, group of diseases designates a variety of transmissible benign and malignant neoplasms of chickens caused by members of the avian retrovirus family. Notably, Exogenous avian leukosis viruses (ALVs), including the subgroups A, B, C, D, J, and K has certain pathogenicity and has induced great economic loss to the poultry industry since 1990s. Vertical transmission via directly infected chicken embryos is the main transmission route, therefore, it is crucial to control avian leukosis virus by well eradication of vertical transmission of ALV in broiler breeder flock. In this study, we analyzed the positive incidence rate of ALV in two ALV well-eradicated broiler breeder flocks and their offspring, by virus isolation, egg albumen p27 detection, and pathological analysis. Our results showed that the ALV positive rate in different generations were really low, even close to zero, which strongly suggest that an excellent effect of good ALV eradication in broiler breeder flock will produce offspring with extremely low positive rate of ALV.

Keywords: Avian leukosis; Nucleus flocks; Eradication

收稿日期:2022-04-21

基金项目:广东省重点领域研发计划资助(2020B020222001);国家肉鸡产业技术体系(CARS-41-G06);广东省农业科学院协同创新中心课题(XT202217)

作者简介:蔡曼珊(1980-),女,硕士,兽医师,研究方向为家禽疾病控制与净化。E-mail:shan296@163.com

*通讯作者:计坚(1983-),男,博士,研究员,研究方向为家禽微生物免疫及遗传调控。E-mail:jjian1017@163.com

自20世纪90年代以来,禽白血病特别是J亚群禽白血病病毒感染给我国养禽业造成了重大经济损失,严重危害了我国肉鸡和蛋鸡产业的健康发展。ALV通过鸡胚从母鸡垂直传播给下一代,这是禽白血病最重要的传播途径^[1]。因此,做好原种鸡的禽白血病净化,控制好垂直传播是该病防控的关键。目前,禽白血病净化方法以及净化过程中需要采取的防控措施已研究得较清楚。但是,生产中净化鸡群跨代净化效果的跟踪报道较少。

本研究对2个已接近完成禽白血病净化的种鸡核心群共进行3个代次禽白血病净化监测。包括对F1代公鸡血浆和精液进行病毒分离、母鸡血浆病毒分离,统计F1代种鸡核心群外源性ALV病毒阳性率;对F1代所产F2代母鸡血浆进行病毒分离,同时对与F2代母鸡配种的公鸡血浆进行病毒分离,统计公、母鸡群外源性ALV病毒阳性率;对F2代配种后所产种蛋进行蛋清p27 ELISA检测,统计种蛋p27抗原阳性率。研究结果显示,所研究的2个核心种鸡群及其往下2个代次,均取得了显著的净化效果。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选择2个接近完成禽白血病净化的鸡群,分别命名为G系、T系,如图1所示。T系的命名方式同G系。

试验通过对F1代母鸡的血浆,公鸡的血浆和精液分别进行病毒分离,统计F1代外源性ALV病

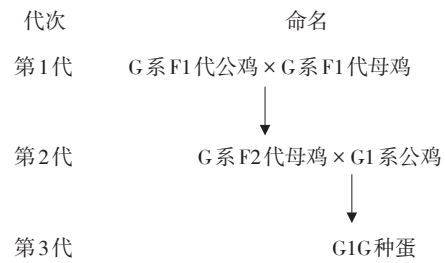


图1 试验所用家系群体

毒分离阳性率。对F1代留种的后代母鸡即F2代母鸡按0.75%-1.5%比例抽测血浆进行病毒分离、对日常死鸡进行解剖,统计F2代母鸡外源性ALV病毒分离阳性率。考虑到配种公鸡精液可能对母鸡造成感染,对与F2代母鸡配种用的公鸡全部进行血浆病毒分离,以降低公鸡通过精液传播感染母鸡及后代的概率。最后对F2代所产种蛋进行蛋清检测,统计种蛋ALV p27抗原阳性率。各代次鸡群饲养量、样品类型、采样数量及检测方法详见表1。

1.2 主要试剂

ALV P27抗原ELISA检测试剂盒、DF-1细胞购自IDEXX公司;胎牛血清、高糖DMEM培养基、胰酶、青链霉素溶液购自Gibco公司。

1.3 采样及检测

1.3.1 血浆采集及检测

使用肝素锂抗凝管采集血样,抗凝血于4℃ 3000 r/min离心5 min,吸取50 μL血浆接种于24孔细胞板中(内含450 μL DF-1细胞生长液),置于5%二氧化碳培养箱中培养,12 h后更换为2%维持液并培养9 d,9 d后收集细胞培养液,取上清用

表1 试验鸡群数量、样品类型及检测方法

品系	样品类型	检测方法	养殖量(只)	抽样方式	检测量(份)
G系F1代母鸡	血浆	病毒分离+ELISA	9646	全检	9646
G系F1代公鸡	血浆和精液	病毒分离+ELISA	346	全检	346
G系F2代母鸡	血浆	病毒分离+ELISA	80000	抽检	600
G1系公鸡	血浆	病毒分离+ELISA	2033	全检	2033
G1G种蛋	种蛋	P27抗原ELISA	-	抽检	3858
T系F1代母鸡	血浆	病毒分离+ELISA	5143	全检	5143
T系F1代公鸡	血浆和精液	病毒分离+ELISA	150	全检	150
T系F2代母鸡	血浆	病毒分离+ELISA	40000	抽检	600
T1系公鸡	血浆	病毒分离+ELISA	1045	全检	1045
T1T种蛋	种蛋	P27抗原ELISA	-	抽检	2400

ALV p27抗原ELISA检测试剂盒进行检测。

1.3.2 精液采集及检测

公鸡使用2 mL无菌离心管采集精液,用无菌PBS 1:4稀释,震荡均匀后4 ℃ 10000 r/min离心5 min,取50 μL上清接种到450 μL DF-1细胞培养液中,置于5%二氧化碳培养箱中培养,12 h后更换为2%维持液并培养9 d,9 d后收集细胞培养液,取上清用ALV p27抗原ELISA检测试剂盒进行检测。

1.3.3 种蛋采集及检测

随机采集蛋网上新鲜的鸡蛋,吸取蛋清于2 mL无菌离心管中,反复冻融3次,用ALV p27抗原ELISA检测试剂盒检测。

1.4 G系、T系F2代母鸡解剖数据统计

F2代母鸡在18~56周龄时对每日所有死鸡进行解剖,记录肿瘤或肝脾肿大比例。对出现肿瘤或肝脾肿大病变的鸡采集肝脏、脾脏,病毒分离检测禽白血病病毒,同时经福尔马林固定做病理切片。

2 结果与分析

2.1 F1代公鸡、母鸡病毒分离结果

由表2可知,G系、T系F1代公鸡的血浆和精液样品病毒分离阳性率均为0。G系F1代母鸡血浆病毒分离阳性率为0.01%,T系F1代母鸡血浆病毒分离阳性率为0。这两个品系公鸡、母鸡ALV阳性率极低,提示该鸡群接近实现禽白血病净化。

表2 F1代ALV病毒分离结果

品系	采样数量(份)	血浆阳性数(份)	血浆阳性率(%)	精液阳性数(份)	精液阳性率(%)
G系F1代公鸡	346	0	0	0	0
G系F1代母鸡	9646	1	0.01	-	-
T系F1代公鸡	150	0	0	0	0
T系F1代母鸡	5143	0	0	-	-

注:“-”代表未检测,下同。

2.2 F2代母鸡和配种公鸡病毒分离结果

由表3可知,G系和T系F2代母鸡各抽测600只,其血浆病毒分离阳性率均为0。与F2代配种用的公鸡全部检测,血浆病毒分离阳性率也为0。

表3 F2代母鸡和配种公鸡ALV病毒分离结果

品系	血浆数量(份)	阳性数(份)	阳性率(%)
G系F2代母鸡	600	0	0
G1系公鸡	2033	0	0
T系F2代母鸡	600	0	0
T1系公鸡	1045	0	0

2.3 G1G种蛋、T1T种蛋p27抗原检测结果

由表4可知,G1G共采集种蛋蛋清3858份,抽测比例为4.75%,p27抗原ELISA检测结果为2份阳性,阳性率为0.05%;T1T共采集种蛋蛋清2400份,抽测比例为6%,p27抗原ELISA检测全部阴性。

表4 G1G种蛋、T1T种蛋p27抗原检测结果

品系	采样周龄(w)	种蛋数量(枚)	阳性数(份)	阳性率(%)
G1G种蛋	24~26	3858	2	0.05
T1T种蛋	22~26	2400	0	0

2.4 F2代母鸡死鸡中肿瘤或大肝大脾比例统计

从表5可知,G系F2代母鸡合计饲养80000只鸡,在18~56周龄共39 w中,死鸡合计3378只,平均周死亡率为0.11%。对所有死鸡进行解剖,仅发现3例肿瘤和3例大肝大脾。

表5 父母代鸡群产蛋期所有死鸡解剖症状统计

品系	死鸡(只)	周死亡率(%)	肿瘤(只)	大肝大脾(只)	病毒分离结果
G系F2代母鸡	3378	0.11	3	3	阴性
T系F2代母鸡	1362	0.09	1	0	阴性

T系F2代母鸡合计饲养40000只,在18~56周龄,死鸡合计1362只,平均周死亡率为0.09%,对所有死鸡进行解剖,仅发现1例肿瘤。

对7只出现肿瘤或大肝大脾的死鸡肝脏、脾脏病料进行病毒分离,没有分离到ALV病毒。肝脏、脾脏病理组织切片的观察结果均排除了禽白血病感染。

3 讨论

3.1 上、下代次鸡群血浆、蛋清禽白血病阳性率分析

G系、T系F1代公鸡血浆和精液病毒分离阳性

率为0, 母鸡血浆病毒分离阳性率低于0.01%, 说明鸡群已接近净化水平。对其后代即F2代母鸡进行抽测, 血浆病毒分离阳性率为0。F2代母鸡开产并进行人工授精后, 对所产种蛋进行p27检测, 结果阳性率低于0.05%, 推测种蛋孵化的后代阳性率很低。结果显示, 当高代次核心鸡群实现净化, 如果再无其他风险因素引入, 往下至少2个代次鸡群都能保持非常低的阳性率甚至零阳性。

3.2 F2代母鸡血浆病毒分离阴性, 所产种蛋p27抗原仍有少量阳性的分析

与母鸡配种的公鸡血浆ALV分离零阳性, 基本排除公鸡通过精液传给母鸡的可能性。据报道, 蛋清检测中有一定比例S/P较低的阳性蛋清样品可能是由对应母鸡体内的内源性ALV排毒所致^[2], 如需进一步确定病毒亚群, 可用阳性蛋清同时做DF-1和CEF细胞病毒分离, 区分内、外源性病毒。另一种可能, 假设阳性率为0.5%, 按95%置信区间计算采样个体, 至少需要采集596个样品。本研究共采集600个样品结果均为阴性, 推断可能是阳性率过低, 600个样品没能覆盖到阳性个体, 如有必要, 则需进一步扩大检测样本量。

3.3 父母代鸡群死鸡解剖数据分析

一般来说, 14周龄以下的鸡很少发生禽白血病临床症状, 其发病高峰通常在性成熟前后。ALV感染对鸡群造成的危害, 诱发内脏肿瘤是表现之一。特别是ALV-J感染, 一般在肿大的肝脏中呈现肿瘤结节。在很多国家, 商品代种鸡群自然感染ALV-J后, 每周的死亡率达1.5%, 超出正常水平^[3-4]。本试验对12万只鸡从18~56周龄所有死鸡进行统计和解剖, 周死亡率约0.1%, 死亡率极低。解剖发现内脏肿瘤或大肝大脾的鸡只占死鸡总数的千分之一, 对这些肿瘤和大肝大脾鸡内脏病料进行病毒分离, 没有分离到ALV。病理切片

同样排除了禽白血病感染的可能性。

3.4 保持后代低阳性率的必要配套措施

毫无疑问, 确保高代次鸡群达到净化水平, 是控制禽白血病垂直传播最关键的因素。生产中, 还需要控制其他影响因素: 包括对鸡群所使用的活疫苗进行外源病毒检测; 已净化的鸡群不与非净化鸡群同机孵化; 净化鸡群不与非净化鸡群同舍育雏等措施。

本试验通过对2个接近净化的核心群连续3代次进行检测跟踪, 借助生产中死亡率和解剖数据辅助判断, 证实高代次净化鸡群在控制好其他影响因素的情况下, 可保持至少2个代次鸡群低阳性率。引种时从实现禽白血病净化的育种公司选择和购入雏鸡非常必要^[5-7]。

4 结论

在原种鸡群基本实现净化的情况下, 配合严格的生物安全措施, 后代鸡群可保持极低的阳性率, 本研究可为企业引种提供数据支撑。

参考文献:

- [1] 崔治中. 禽白血病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 9-297.
- [2] 郝建勇, 秦建如, 邱倩倩, 等. 不同样品对黄羽种鸡禽白血病病毒净化检测效果的影响[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 29-34.
- [3] 崔治中. 我国鸡群中禽白血病流行现状和对策[J]. 中国家禽, 2009, 31(13): 1-3.
- [4] Y.M.SSIF. 禽病学. 第十二版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 599-616.
- [5] 崔治中. 种鸡场禽白血病净化技术手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018: 11-68.
- [6] 俞燕, 徐步, 范建华, 等. 地方鸡种保种核心群禽白血病净化研究[J]. 中国家禽, 2019, 41(19): 16-22.
- [7] 秦卓明, 徐怀英, 马秀丽, 等. 山东省地方品系种鸡禽白血病净化技术的经验与探讨[J]. 家禽科学, 2016(12): 3-11.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.10

丙泊酚麻醉对犬生理指标的影响

龙海斌, 杜志国, 倪庆纯, 胡敏华*

(广州医药研究总院有限公司实验动物研究开发中心, 国家犬类实验动物资源库,
广东广州 510240)

摘要: 静脉注射丙泊酚可用于犬的诱导与维持麻醉。为充分了解丙泊酚相关的麻醉方案对犬机体的影响, 确保犬在麻醉过程中的安全和实验结果的准确性, 本文从心血管功能、呼吸功能、眼压和免疫状态等几个方面, 综述兽医临床利用丙泊酚对犬进行麻醉后生理指标的变化情况, 旨在为制定实验犬的麻醉方案提供参考。

关键词: 实验动物麻醉; 犬; 丙泊酚; 生理指标

中图分类号: S859.79*1 文献标识码: B 文章编号: 1005-8567(2022)05-0050-04

Effect of intravenous propofol on canine physiological index

LONG Haibin, DU Zhiguo, NI Qingchun, HU Minhua*

(Laboratory Animal Research and Development Center, Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd, National Canine Laboratory Animal Resources, Guangzhou Guangdong, 510240)

Abstract: Intravenous propofol can be used to induce and maintain anesthesia in dogs. To fully understand the effects of relevant anesthesia protocols on dogs and ensure the safety and accuracy of experimental results, this paper reviewed the changes of different physiological indexes (including cardiovascular function, respiratory function, intraocular pressure and immune status) of dogs anesthetized by propofol in veterinary clinic, which aims to provide reference for the formulation of anesthetic program for experimental dogs.

Keywords: Anesthesia for laboratory animals; Dog; Propofol; Physiological indexes

丙泊酚(Propofol, 2, 6-二异丙基苯酚)是一种非巴比妥类静脉麻醉药, 最初被用于人的诱导和维持麻醉^[1-2]。与其它静脉注射麻醉使用的中枢神经抑制剂相比, 丙泊酚具有诱导麻醉迅速、催眠效果好及肌肉松弛效果良好的特点。丙泊酚无累积效应, 麻醉完成后, 犬只恢复速度快^[3]。目前, 丙泊酚已广泛应用于兽医临床中的犬只诱导、维持麻醉。在利用实验犬(主要为Beagle犬)进行科学研究的过程中, 对犬的麻醉已经成为实验过程中必须解决的难题。除了动物伦理的原因, 实验过程

中减轻实验动物不必要的疼痛和痛苦也可提高所获得的科学数据的质量。疼痛和痛苦可导致细胞因子的产生及内分泌代谢状态的激活, 转化为一系列效应, 如免疫反应和愈合速度的下降, 术后肿瘤转移保留的增加, 以及慢性疼痛状态的发展。因此, 疼痛和痛苦可能是不受控制的实验变量, 对研究结果有显著影响。减少疼痛和痛苦的程度, 可使动物的福利和科学成果都受益^[4-5]。本文总结了兽医临床上利用丙泊酚麻醉犬时某些生理指标的变化, 以供实验过程中麻醉犬只时参考。

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 广东省科技计划项目(2021B1212060001)

作者简介: 龙海斌(1984-), 硕士, 主要从事犬类实验动物质量控制研究。E-mail: 30848264@qq.com

*通信作者: 胡敏华(1983-), 高级畜牧师, 主要从事实验动物疾病模型研究。E-mail: myemail-cony@163.com

1 对心血管功能的影响

丙泊酚给药后导致的心血管变化为动脉血压略有下降而心率无代偿性增加。Bustamante 等对健康犬进行整形外科手术时, 利用布比卡因 (Bupivacaine) 和吗啡 (Morphine) 进行硬膜外麻醉的情况下, 比较采用丙泊酚全凭静脉麻醉 (total intravenous anaesthesia, TIVA) 和吸入异氟醚进行维持麻醉时, 两种麻醉方案对犬只平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 的影响^[6]。结果发现, 丙泊酚组的 MAP (92±17) mmHg 显著高于异氟醚组 (78±10) mmHg。KÜRÜM 等在犬卵巢子宫切除术中利用丙泊酚与瑞芬太尼 (Remifentanyl) 或芬太尼 (Fentanyl) 联合使用维持麻醉, 结果发现麻醉过程中两种方案均发现心率、收缩压、平均动脉压下降的情况^[7]。

健康动物对丙泊酚引起的心血管抑制作用具有良好的耐受性。胡俊杰等发现, 与静松灵、速眠新相比, 丙泊酚麻醉对犬心电图的影响最小^[8]。Deryck 等通过测量丙泊酚维持麻醉过程中的左心室压力、主动脉压和血流量发现, 丙泊酚可降低动脉张力, 而不影响动脉硬度和心室后负荷或心室功能^[9]。这表明对于左心室功能受损的犬来说, 丙泊酚可能是更好的麻醉药物。但在低血容量和心脏储备有限的犬中, 即使是小剂量的丙泊酚 (0.75 ~ 1.5 mg / kg, i.v.) 也可能产生明显的低血压^[10]。

2 对呼吸功能的影响

丙泊酚全凭静脉麻醉 (total intravenous anaesthesia, TIVA) 可引起犬呼吸功能下降, 其特征是呼吸速率降低和呼吸暂停。强效 α_2 镇静剂/镇痛剂 (例如 甲苯噻嗪 Xylazine, 右美托咪啶 Dexmedetomidine) 或阿片类药物 (如 羟吗啡酮 Oxymorphone, 布托啡诺 Butorphanol) 与丙泊酚联合使用, 增加了麻醉期间呼吸抑制的可能性^[11]。Bustamante 等利用丙泊酚 TIVA 过程中, 发现有 78.5% (11/14) 的犬因潮气末二氧化碳浓度 (End-tidal carbon dioxide concentration, EtCO₂) 升高需要机械通气, 且丙泊酚的输注速度与呼吸抑制发生几率有关, 输注速度越高呼吸抑制发生几率越

大^[6]。

麻醉诱导后常发生一段时间的呼吸暂停的表现称为诱导后呼吸暂停 (postinduction apnea, PIA), PIA 与麻醉深度无关^[12]。PIA 被认为是严重的麻醉不良事件, 因为它可以导致低氧血症、呼吸性酸中毒等症状^[13]。诱导麻醉时, 大多数静脉注射型麻醉剂在血浆药物浓度和有效部位足够的药物浓度之间存在时间延迟。这种迟滞现象取决于多种因素, 包括药物的理化性质、心排血量、给药剂量和给药速度等^[12]。

适当地减少丙泊酚给药剂量和给药速度可降低呼吸抑制和 PIA 发生率。周正旭等发现, 利用硬膜外麻醉的复合麻醉手段, 可适当降低丙泊酚剂量, 大幅度减少呼吸抑制^[14]。Bigby 等为评价丙泊酚给药后对 PIA 发生率的影响, 利用健康犬进行实验, 麻醉前给药为肌肉注射 0.5 mg/kg 美沙酮 (Adanon) 和 5 μ g/kg 右美托咪啶, 30 min 后静脉注射丙泊酚进行诱导麻醉, 注射速度分别为 1 mg/kg / min 或 4 mg/kg/min^[12]。结果发现, 低给药速率会导致诱导剂量下降, PIA 发生率降低。

3 对眼内压的影响

眼内压 (intraocular pressure, IOP) 突然升高对患有青光眼或角膜病变的动物有严重的负面影响, 应尽量避免。IOP 急剧升高可导致视神经损伤、眼球破裂或眼球内容物脱出 (如角膜或巩膜不稳定), 从而增加发病率和预后不良。所以, 患有眼部疾病的动物在接受眼部手术或其他无关手术时, 应考虑麻醉方案可能会对 IOP 产生的负面影响^[15]。

Hasiuk 等发现, 丙泊酚诱导麻醉犬后, IOP 显著增加^[16]。同时, Hofmeister 等发现丙泊酚的使用剂量与 IOP 升高与否没有直接联系^[17]。Smith 等发现, 虽然使用氢吗啡酮 (hydromorphone) 和右美托咪啶进行麻醉前镇静可显著降低正常犬的眼压, 但在丙泊酚诱导麻醉后 IOP 均显著增加, 消除了术前用药的效果^[15]。

4 对免疫状态的影响

大多数麻醉药对细胞和神经体液免疫具有免疫抑制作用^[18]。丙泊酚不仅影响神经系统, 还可

以通过调节中性粒细胞功能影响宿主炎症反应, 减少促炎细胞因子产生, 改变一氧化氮(NO)表达, 抑制中性粒细胞的功能。由于丙泊酚不溶于水, 它是在含有大豆油、甘油和卵磷脂的乳剂中形成的, 而脂质载体本身亦具有生物活性^[19]。

Sato 等评估丙泊酚及其脂质载体对犬中性粒细胞功能的调节作用^[20]。结果发现, 丙泊酚或脂质载体给药后, 外周血白细胞和中性粒细胞计数降低。丙泊酚或脂质载体显著降低了犬中性粒细胞粘附能力。Pei 等探索了丙泊酚对犬外周血单核细胞的抗炎作用^[21]。结果发现, 非细胞毒性剂量的丙泊酚显著抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的犬外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中NO的释放和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)以及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)的基因表达。非细胞毒性剂量的丙泊酚预处理, 可降低PBMCs中诱导型一氧化氮合酶(inducible NO synthase, iNOS)的蛋白表达;通过抑制核转录因子NF- κ B p65蛋白的核转位来下调犬PBMCs中LPS诱导的炎症反应。亦有研究表明, 丙泊酚TIVA与吸入麻醉的方式相比具有更好的免疫保护作用。Tomihari 等利用丙泊酚(P组)和异氟醚(I组)麻醉健康犬2小时后, 两组的外周血淋巴细胞数量均减少, 但P组减少量显著低于I组。P组PBMC的T淋巴细胞亚群中CD3⁺、CD4⁺比例显著高于I组($P < 0.05$)^[18]。P组中IL2(促炎细胞因子)及IL10(抗炎细胞因子)两种细胞因子在2小时的麻醉时间内保持稳定。

5 丙泊酚可引起的不良反应

丙泊酚在大豆油、甘油和纯化的卵磷脂乳液中形成1%的溶液, 是一种悬浮在乳液系统中的麻醉剂, 乳液主要成分为蛋黄卵磷脂和大豆油, 对这些物质过敏的犬只使用丙泊酚可能会引起过敏症状^[22]。Onuma 等建议对蛋黄卵磷脂或大豆油有过敏性疾病史的犬使用丙泊酚时, 应仔细进行围术期麻醉监测和准备其他麻醉方案^[23]。

Cattai 等分析了使用丙泊酚TIVA导致犬肌阵挛的发生率, 结果发现1.2%的犬在接受静脉注射麻醉后产生了肌阵挛的现象, 需要进行药物治疗^[24]。Franci 等报道了一起由于误用细菌污染的

丙泊酚进行麻醉导致犬只死亡的案例^[25]。

6 结语

随着生物医药行业的快速发展, 犬类实验动物需求与应用规模越来越大, 对其麻醉方案的要求也会更加的多样化。在实验过程中, 对实验用犬进行安全、可靠的麻醉与保定, 是取得实验成功的一个重要基础。丙泊酚作为近年来引进兽医临床的麻醉药品, 因其诱导、催眠、肌肉松弛效果好及恢复速度快的优点, 得到了越来越多的应用。丙泊酚用于犬只麻醉时, 对心血管功能影响较小, 对呼吸功能具有剂量依赖性的抑制作用, 可增高犬的眼内压, 同时具有一定的免疫保护作用。技术人员在使用丙泊酚麻醉的过程中, 应注意以上生理指标变化对犬只及试验结果的影响, 及时调整麻醉方案或有选择的排除麻醉药物的影响因素。

虽然呼吸麻醉逐渐成为了主流麻醉方式, 但受设备、成本、场地制约, 以及某些不便使用呼吸麻醉方式的实验等情况影响, TIVA 仍然是不可或缺的麻醉方式。丙泊酚因其独特的优势, 既可用于诱导麻醉, 也可用于短期、长期的维持麻醉, 与呼吸麻醉方式形成互补, 完成更多情况下的麻醉、保定任务, 保障各项实验的顺利开展。

参考文献:

- [1] GEPTS E, CLAEYS M, CAMU F, et al. Infusion of propofol ('Diprivan') as sedative technique for colonoscopies [J]. Postgraduate Medical Journal, 1985, 61(Suppl 3): 120-126.
- [2] KAY N H, UPPINGTON J, SEAR J W, et al. Use of an emulsion of ICI 35868 (Propofol) for the induction and maintenance of anaesthesia [J]. British Journal of Anaesthesia, 1985, 57(8): 736-742.
- [3] BOLAJI-ALABI F B, SOLANKE O I, ADETUNJI A. Effect of oxygen supplementation on propofol anesthesia in acepromazine/tramadol premedicated dogs [J]. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2018, 6(2): 239-242.
- [4] SILVERMAN J. The IACUC Handbook [M]. Florida: CRC Press, 2006.
- [5] 杜志国, 龙海斌, 胡敏华. 丙泊酚在犬麻醉中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(5): 138-142.
- [6] BUSTAMANTE R, AGUADO D, CEDIEL R, et al. Clinical comparison of the effects of isoflurane or propofol anaesthesia on mean arterial blood pressure and ventilation in dogs undergoing orthopaedic surgery receiving epidural anaesthesia [J]. The

- Veterinary Journal, 2018, 233: 49-54.
- [7] KÜRÜM B, PEKCAN Z, KALENDER H, et al. Comparison of Propofol-Remifentanyl and Propofol-Fentanyl Anesthesia During Ovariohysterectomy in Dogs [J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2013, 19(Supplement A): A33-A40.
- [8] 胡俊杰, 尚清炎, 李绪权, 等. 三种麻醉剂对犬心电图的影响分析[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(1): 107-110.
- [9] DERYCK Y L, FONCK K, L D E B, et al. Differential effects of sevoflurane and propofol anesthesia on left ventricular-arterial coupling in dogs [J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2010, 54(8): 979-986.
- [10] SHORT C E, BUFALARI A. Propofol anesthesia[J]. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 1999, 29(3): 747-778.
- [11] QIU Q, CHOI S, WONG S, et al. Effects of intra-operative maintenance of general anaesthesia with propofol on postoperative pain outcomes - a systematic review and meta-analysis[J]. Anaesthesia, 2016, 71(10): 1222-1233.
- [12] BIGBY S E, BETHS T, BAUQUIER S, et al. Effect of rate of administration of propofol or alfaxalone on induction dose requirements and occurrence of apnea in dogs [J]. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2017, 44(6): 1267-1275.
- [13] BIGBY S E, BETHS T, BAUQUIER S, et al. Postinduction apnoea in dogs premedicated with acepromazine or dexmedetomidine and anaesthetized with alfaxalone or propofol [J]. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2017, 44(5): 1007-1015.
- [14] 周正旭, 刘建涛, 闫立雯, et al. 丙泊酚复合硬膜外阻滞对犬的麻醉效果及其对呼吸系统的影响[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(4): 52-55.
- [15] SMITH M D, BARLETTA M, DIEHL K A, et al. Effect of propofol and ketamine - diazepam on intraocular pressure in healthy premedicated dogs [J]. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2019, 46(1): 36-42.
- [16] HASIUK M M, FORDE N, COOKE A, et al. A comparison of alfaxalone and propofol on intraocular pressure in healthy dogs [J]. Veterinary Ophthalmology, 2014, 17(6): 411-416.
- [17] HOFMEISTER E H, WEINSTEIN W L, BURGER D, et al. Effects of graded doses of propofol for anesthesia induction on cardiovascular parameters and intraocular pressures in normal dogs [J]. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2009, 36(5): 442-448.
- [18] TOMIHARI M, NISHIHARA A, SHIMADA T, et al. A comparison of the immunological effects of propofol and isoflurane for maintenance of anesthesia in healthy dogs [J]. The Journal Veterinary Medical Science, 2015, 77(10): 1227-1233.
- [19] MARIK P E. Propofol: An Immunomodulating Agent [J]. 2005, 25(5 Pt 2): 28-33.
- [20] SATO R, AOKI T, KOBAYASHI S, et al. The modulating effects of propofol and its lipid carrier on canine neutrophil functions [J]. The Journal of veterinary medical science, 2017, 78(12): 1825-1829.
- [21] PEI Z, WANG J. Propofol attenuates LPS - induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and nitric oxide expression in canine peripheral blood mononuclear cells possibly through down-regulation of nuclear factor (NF)-kappaB activation [J]. The Journal Veterinary Medical Science, 2015, 77(2): 139-145.
- [22] SANO T, NISHIMURA R, MOCHIZUKI M, et al. Clinical Usefulness of Propofol as an Anesthetic Induction Agent in Dogs and Cats [J]. The Journal of veterinary medical science, 2003, 65(5): 641-643.
- [23] ONUMA M, TERADA M, ONO S, et al. Incidence of anaphylactic reactions after propofol administration in dogs [J]. The Journal of veterinary medical science, 2017, 79(8): 1446-1452.
- [24] CATTAI A, RABOZZI R, NATALE V, et al. The incidence of spontaneous movements (myoclonus) in dogs undergoing total intravenous anaesthesia with propofol [J]. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2015, 42(1): 93-98.
- [25] FRANCI P, DOTTO G, CATTAI A, et al. Lethal septic shock after dental scaling in a healthy dog due to Ochrobactrum anthropi - contaminated propofol [J]. Journal of Small Animal Practice, 2015, 56(5): 345-347.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.11

犬慢性支气管炎的诊治报告

罗子鹏, 丁庆宇, 李蕾, 尤建艺, 张辉, 郭剑英, 唐兆新, 韩庆月*
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:犬慢性支气管炎是指气管、支气管黏膜及其周围组织的慢性非特异性炎症, 通常是由于病因长期刺激, 或急性病例在治疗上的拖延, 又或是饲养管理等引起的。本文通过对一例犬慢性支气管炎病例的诊断和治疗, 探讨其发病原因与防治, 以期为临床工作提供一定的参考。

关键词: 犬; 慢性支气管炎; X线; 呼吸系统

中图分类号: S856.3 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)05-0054-05

A case report of canine chronic bronchitis

LUO Zipeng, DING Qingyu, LI Lei, YOU Jianyi, ZHANG Hui, GUO Jianying, TANG Zhaoxin, HAN Qingyue*
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract: Canine chronic bronchitis refers to chronic non-specific inflammation of the trachea, bronchial mucosa, and surrounding tissues, usually due to long-term stimulation of pathogenic factors, delay in treatment of acute cases, or improper husbandry. Through the diagnosis and treatment of a canine chronic bronchitis case, the pathogenesis and prevention methods were discussed to provide some references for the clinical diagnosis and treatment of this disease.

Keywords: Canine; Chronic bronchitis; X-ray; The respiratory system

犬慢性支气管炎(Canine chronic bronchitis)的发生常常是因为急性支气管炎的致病因素未能及时除去, 长期反复作用的结果, 或是受慢性刺激的长期影响^[1]。老龄动物由于呼吸道防御功能下降, 喉头反射减弱, 单核-吞噬细胞功能减弱, 慢性支气管炎发病率较高。此外, 动物缺乏维生素A、维生素C时, 会影响其支气管粘膜上皮的修复, 使其更容易发生慢性支气管炎。某些营养物质如维生素C、维生素A缺乏, 会影响支气管粘膜上皮的修复, 降低溶菌酶的活力, 也容易诱发本病。另外, 本病可由心瓣膜病, 慢性肺脏疾病(如鼻疽、结核、肺蠕虫病、肺气肿等)或肾炎等激发引起。持续性的咳嗽是慢性支气管炎的一个重要特征, 可持续

数周、数月, 甚至是数年^[2]。

慢性支气管炎通常是难以完全治愈的, 只能用药来缓解其症状、减轻患畜的痛苦。因此, 当动物发生咳嗽等症状时, 应该立即送往医院接受治疗, 以防急性支气管炎转为慢性。另外, 寒冷天气应当注意保暖, 防止受凉。平时应供给营养丰富、容易消化的饲料, 加强环境卫生和饲养管理工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床病例

病例情况: 雌性小鹿犬, 9岁, 体重4 kg。2021年10月7日前来就诊。主诉就诊前一个月开始咳

收稿日期: 2022-04-24

作者简介: 罗子鹏(1999-), 男, 学生, 本科。E-mail: 1874267253@qq.com

*通讯作者: 韩庆月(1990-), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 兽医内科学。E-mail: 1179353482@qq.com

嗽,频率较高,与多犬混养,与野外接触频繁。

1.1.2 主要仪器

深圳迈瑞(MINDRAY)全自动五分类血液细胞分析仪(BC-5000);施诺华(SHINOVA)固定式兽用数字化X射线摄影系统(DR-200)。

1.1.3 主要试剂和药品

试剂:柠檬酸钠、生理盐水、蒸馏水等。

药品:兽用阿米卡星注射液、兽用地塞米松注射液、兽用氨茶碱注射液、苯海拉明注射液、兽用盐酸多西环素注射液、兽用阿奇霉素注射液、兽用复合维生素B注射液、兽用5%葡萄糖氯化钠注射液、止咳缓释片、果根素甘胆口服液、犬窝咳疫苗等。

1.2 检查方法

1.2.1 基本检查

体温:38.2℃,呼吸:25次/分钟,脉搏:98次/分钟。问诊可知,就诊前一个月开始出现咳嗽,频率比较高,与多犬混养,有野外接触史。视诊可见,动物精神尚可,保持坐立姿态。听诊可得,呼吸伴有尖锐较响亮异常音,咳嗽频繁,支气管啰音,人工诱咳阳性。触诊可得,其会阴部见柔软包块,按压无痛感,为会阴疝。

1.2.2 血液生化检查

于患犬前肢头静脉采血2~3 mL,静置后分离出血清,对患犬进行血清生化检查,结果见表1。

表1 血清生化检查结果

项目	单位	结果	参考值
谷丙氨酸氨基转移酶	ALT U/L	200.00 ↑	10.00~100.00
门冬氨酸氨基转移酶	AST U/L	31.6	4.00~56.00
碱性磷酸酶	ALP U/L	219.4	20.00~225.00
谷氨酰转肽酶	γ-GT U/L	51.10 ↑	0.00~9.00
总蛋白	TP g/L	70	50.00~82.00
尿素	UREA mmol/L	4.87	2.00~10.00
肌酐	CREA μmol/L	31.80 ↓	50.00~140.00
血糖	GLU mmol/L	7.39	4.11~7.95
总胆固醇	TC mmol/L	4.74	2.84~8.26
甘油三酯	TG mmol/L	1	0.11~1.56
肌酸激酶	CK U/L	135.7	30.00~200.00
钙	Ca mmol/L	2.69	1.98~3.00
磷	P mmol/L	1.31	0.81~2.91
总胆红素	T-bil μmol/L	0.04	0.00~15.00
白蛋白	ALB g/L	33.4	21.00~39.00

注:↑表示数值偏高,↓表示数值偏低

血清生化检查可见,该动物ALT、γ-GT数值偏高;CREA偏低;T-bil数值略低,但在参考范围内;其他指标均无异常(表1)。提示有肝胆损伤,可能存在内分泌方面的问题。

1.2.3 C-反应蛋白检测

将血清稀释后滴加于试纸条加样孔,插入机器检测C-反应蛋白,结果见表2。该动物CRP检测结果为5.80 mg/L,在正常范围内,表明患犬无明显的炎症反应。

表2 犬C反应蛋白检查结果

项目	单位	结果	参考值
犬C反应蛋白(CRP)	mg/L	5.8	0.00~10.00

1.2.4 皮质醇检测

将血清滴加到试剂板中检测皮质醇,结果见表3。该动物皮质醇检测结果为10.00 nmol/L,低于正常范围。很大可能是年龄较高引起的。

表3 皮质醇检查结果

项目	单位	结果	参考值
皮质醇(Cortisol)	nmol/L	10.00 ↓	16.60~166.00

注:↑表示数值偏高,↓表示数值偏低

1.2.5 甲状腺T4检查

将血清滴加到试剂板中检测甲状腺T4。结果见表4。甲状腺T4是判断甲状腺功能亢进或甲状腺功能低下的常用指标。该动物皮质醇检测结果为10.00nmol/L,低于正常范围。很大可能是年龄较高引起的。

表4 甲状腺T4检查结果

项目	单位	结果	参考值
甲状腺T4	μL/dL	10.00 ↓	13.00~51.00

注:↑表示数值偏高,↓表示数值偏低

1.2.6 血液原虫四合一检查

将血清滴加到试剂板中检测血液原虫。结果见表5。该犬只血液原虫四合一检查结果为阴性,可排除常见寄生虫感染的可能性。

表5 犬血液原虫四合一检查结果

项目	单位	结果	参考值
犬血液原虫四合一4DX检查	次	阴性	/

1.2.7 X线检查

将患犬妥善保定后,进行全身X光拍照,拍摄部位为腹背位(图1)和右侧位(图2)。可见肺纹理增粗,心影1-3点钟方向增大,肺血管未见明显增粗。提示支气管炎,肺动脉、左心耳扩大,可初步诊断为慢性支气管炎^[3]。

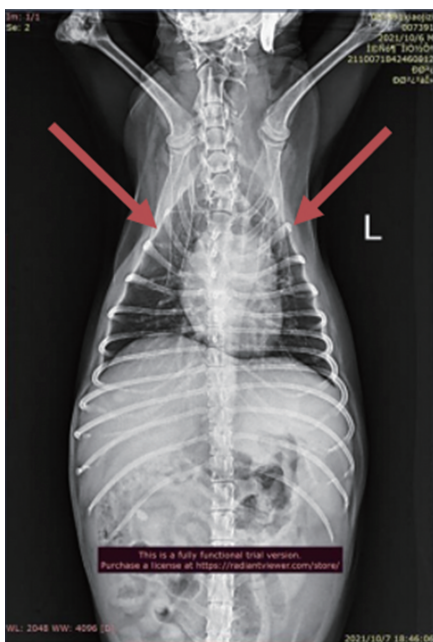


图1 X线检查结果(腹背位)

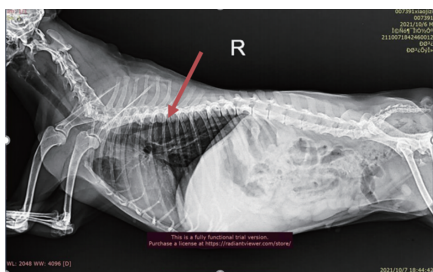


图2 X线检查结果(右侧位)

2 诊断与治疗

2.1 诊断

根据主诉、病史及一般临床检查结果,怀疑以下

几种类型疾病:犬窝咳,寄生虫感染(有野外接触史),过敏,细菌感染,肿瘤(老龄犬)。再结合血清生化检查、血液寄生虫四合一检查阴性、X光检查结果等,可初步排除过敏、寄生虫感染与肿瘤问题。从而诊断为慢性支气管炎,然后进行常规药物治疗。

2.2 治疗

2.2.1 紧急接种犬窝咳疫苗

由于患犬没有接种过犬窝咳疫苗,首先进行犬窝咳疫苗的紧急补种。发生犬窝咳的犬只,后期可能发生继发感染,导致各种呼吸系统疾病,引起严重的咳嗽和呼吸道症状,甚至危及生命^[4]。

2.2.2 加强护理

肌肉注射:兽用复合维生素B注射液(2 mL),1天1次,使用至出院当日。复合维生素B参与机体新陈代谢过程,为体内多种代谢环节所必需的辅酶和提供组织呼吸的重要辅酶。

2.2.3 抑菌

静脉注射:兽用阿米卡星注射液(2 mL:0.2 g)、兽用盐酸多西环素注射液(5 mg),1天1次,使用至出院当日。口服:兽用阿奇霉素悬混剂1袋,1天1次,使用至出院当日。阿米卡星为氨基糖苷类抗生素,能抑制细菌蛋白质的合成,使细菌细胞膜的通透性增强;多西环素为半合成四环素类抗生素,主要是通过干扰细菌蛋白质的合成来发挥药效;阿奇霉素为大环内酯类半合成抗生素,能抑制敏感菌蛋白质的合成,主要对多数革兰阳性菌、少数革兰阴性、支原体等有良好的作用^[5]。

5天后,由于治疗作用不理想,又加用麻佛微素,至出院当日。麻佛微素是氟喹诺酮类抗菌药,通过抑制细菌的DNA转录酶从而抑制细菌的生长,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和支原体均有抗菌作用,对呼吸道感染有较好的疗效^[5]。

2.2.4 消炎

肌肉注射:兽用地塞米松注射液(2 mL:5 mg)、苯海拉明注射液(20 mg),1天1次,使用至出院当日。地塞米松为糖皮质激素,具有抗炎、免疫抑制等作用;苯海拉明是H1受体阻断药,对H1受体有较强的亲和力,能产生竞争性阻断作用,从而拮抗组胺的生物学效应^[5]。

2.2.5 祛痰止咳

皮下注射:兽用氨茶碱注射液(2 mL:0.25 g),

1天1次,使用至出院后5天。氨茶碱为平喘药,具有支气管平滑肌松弛、兴奋呼吸、强心的作用。

口服:兽用止咳缓释片1粒,1天1次,使用至出院后5天。主要是缓解咳嗽,止咳平喘。

2.3 预后

住院治疗12日后动物症状缓解,情况稳定。开具5日量长效氨茶碱、止咳缓释片出院。出院一星期后回访,主人表示动物在家中精神良好,饮食正常,活动正常。

3 讨论

3.1 病因

大多数慢性支气管炎通常是由急性支气管转变而来,常见于致病因素未能及时消除,长期反复作用,或未能及时治疗,饲养管理及使役不当。老龄动物由于呼吸道防御功能下降,喉头反射减弱,单核-巨噬细胞系统功能减弱,机体抵抗力下降,此时极易受到各种病原微生物和疾病的侵袭,如肺炎球菌、铜绿假单胞菌、衣原体、霉菌和病毒等。或在各种条件作用下,附生于气管黏膜处的常在性微生物具备了侵袭力,呈现出致病作用。某些营养物质如维生素C、维生素A缺乏,会影响支气管黏膜上皮的修复,降低溶菌酶的活力,也容易诱发本病。另外,本病可由心瓣膜病,慢性肺脏疾病(如鼻疽、结核、肺蠕虫病、肺气肿等)或肾炎等激发引起^[2-3]。此外,该病还可以继发于心肺疾病、肾炎、吞咽障碍、传染病、寄生虫病等。

3.2 临床症状

呼吸次数增加、咳嗽频繁、流鼻涕、有痰液咳出、偶有呼吸困难并伴有尖锐杂音、支气管啰音、可视黏膜发绀、病程长、持续时间久等;早晚气温较低时,常常出现剧烈咳嗽;人工诱咳阳性;体温无明显变化;有的病畜因支气管狭窄和肺泡气肿而出现呼吸困难;一般情况下,病畜痰量较少,有时会混有少量的血液,急性发作并伴有细菌感染时,咳出大量粘液性脓性痰液;X线检查可见,病初无明显异常,后期由于支气管壁增厚,细支气管或肺泡间质炎症细胞浸润或纤维化,可见肺纹理增粗、紊乱,呈网状或条索状、斑点状阴影^[5]。

3.3 鉴别诊断

慢性支气管炎的特征为:持续性咳嗽时本病的

特征,可拖延数月或数年;运动、采食、早晚气温较低时,往往出现剧烈咳嗽;人工诱咳阳性;体温无明显变化;X线检查,早期无异常,后期肺纹理增粗、紊乱。小动物临床上通常需要同下列呼吸系统疾病进行鉴别诊断。

(1)急性支气管炎:咳嗽,病初为干、短、疼痛性咳嗽,后转为湿而长的咳嗽。有时咳出较多的黏液或黏液脓性的痰液,呈灰白色或黄色;同时,鼻孔流出浆液性、黏液性或黏液脓性的鼻液。X线检查仅见肺纹理增粗,无其他明显异常。

(2)支气管肺炎:弛张热,发短钝痛咳、呼吸困难,叩诊呈局灶性浊音区,听诊病变部肺泡呼吸音减弱或消失。X线检查,表现斑片状或斑点状阴影,大小和形状不规则,密度不均匀,边缘模糊不清,可沿肺纹理分布。

(3)感冒:遭遇寒冷刺激后突然发病,体温升高,精神沉郁,食欲减退甚至废绝,咳嗽,眼结膜充血潮红并伴轻度肿胀,流泪,眼结膜充血潮红并伴轻度肿胀,打喷嚏,耳尖、鼻及四肢末端发凉。病初流清水样鼻液,后变浓稠。听诊,肺泡呼吸音增强,心音增强,心跳加快。应用解热剂治疗,临床症状迅速得到改善,即可诊断为感冒。

(4)犬传染性支气管炎:阵发性咳嗽,吸气性呼吸困难,胸部听诊呼吸音粗粝、有啰音。

(5)细菌性肺炎:急性咳嗽、嗜睡、呼吸窘迫;X线片见间质型-肺泡型分布,常呈颅腹侧分布。

3.4 抗生素的选择

犬的慢性支气管机体通常是由于抵抗力下降,继而受到各种病原微生物和疾病的侵袭,如肺炎球菌、铜绿假单胞菌、衣原体和霉菌等。故在临床上应尽量选取广谱抗生素进行治疗,如喹诺酮类、大环内酯类、 β 内酰胺类等。考虑到细菌耐药性及个体差异等问题,在整个治疗的过程中应密切关注患犬的病情和身体状况等,以便及时调整用药。此外,可采集患犬的痰液、咽拭子等,进行病原的分离培养以及药敏试验,再结合患犬的年龄、性别、身体状况等综合分析,进而选择更为安全、有效且实惠的抗生素。

3.5 中药疗法

中药治疗的主要原则是益气敛肺、化痰止咳,可选用参胶益肺散:党参、阿胶各60g,黄芪45g,

五味子 50 g, 乌梅 20 g, 桑皮、款冬花、川贝、桔梗、米壳各 30 g, 共研末, 开水冲服^[4]。另外, 有研究表明, 小青龙汤具有止咳、平喘、增强动物机体免疫力等药理作用, 对治疗慢性支气管炎有一定的帮助^[9]。服用小青龙汤后, 咳嗽、气喘、肺部啰音等症状均有所改善; 同时, 机体内免疫球蛋白含量有所提升^[10]。再者, 清肺化痰汤具有清热化痰的作用, 能一定程度上对患畜的呼吸功能有所改善。

3.6 预后

慢性支气管炎一般难以完全痊愈, 只能通过用药缓解其发病症状。该病病程通常很长, 可长达几周、几个月甚至是几年, 往往会导致肺膨胀不全、肺泡气肿、支气管狭窄、支气管扩张等呼吸系统疾病。

3.7 预防

平时要做好卫生消毒工作, 生活环境要保持通风良好, 温度、湿度适宜等; 气温下降时, 尤其是换季时分, 要注意添衣保暖, 以防着凉。

如果动物咳嗽, 应及时治疗, 加强护理, 防止急性支气管炎变成慢性支气管炎。在寒冷的天气里保持温暖。提供营养和易消化的饲料。改善环境卫生, 避免烟尘和刺激性气体对呼吸道的影 响。另外, 提高动物抵抗力, 加强动物呼吸道的自然防御同样至关重要。

参考文献:

- [1] 陈怀涛, 许乐仁. 兽医病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005:438-470.
 - [2] 徐明光. 动物内科学[M]. 北京: 延边大学出版社, 2018:79-84.
 - [3] TURK J R, RANTANEN N W. Chronic bronchitis, cardiomegaly and medial hypertrophy of small pulmonary arteries in a dog [J]. Journal of Small Animal Practice. 1982, 23(11): 719-723.
 - [4] 李晓娟, 李树东. 犬窝咳病的综合防治[J]. 特种经济动植物, 2011, 14(5):16-17.
 - [5] 陈仗榴, 曾振林. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017:229-299.
 - [6] 黄可和. 兽医内科学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2020: 122-123.
 - [7] 柳俊. 舒适护理在慢性支气管炎患者中的应用效果[J]. 中国民康医学, 2021, 33(15):153-154.
 - [8] 王玉梅. 综合护理应用于慢性支气管炎急性发作患者中的效果[J]. 中国医药指南, 2021, 19(20):4-6.
 - [9] 周扬. 阿奇霉素与左氧氟沙星在慢性支气管炎治疗中的应用及评价[J]. 中国医药指南, 2021, 19(25):15-17.
 - [10] 束莉. 小青龙汤治疗慢性支气管炎的效果探讨[J]. 中医临床研究, 2020, 12(35):35-37.
 - [11] 刘建, 薛宁. 小青龙汤配合针灸治疗老年慢性支气管炎的临床疗效[J]. 内蒙古中医药, 2020, 39(12):8-9.
-
- 能的效果观察[J]. 畜禽业, 2007, 222(10):9-10.
- [6] 孔宪军, 何在启, 曹际志. 柠檬酸对蛋鸡生产性能影响的研究[J]. 山东畜牧兽医, 2000, (1):3.
 - [7] WALDROUP A, KANIAWATI S, MAUROMOUSTAKOS A. Performance characteristics and microbiological aspects of broilers fed diets supplemented with organic acids[J]. Journal of Food Protection, 1995, 58(5):482-489.
 - [8] 孙小琴, 龚月生, 段玉兰. 柠檬酸对蛋鸡消化道内容物 pH 和盲肠菌群的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, (4):41-45.
 - [9] 王淑琴, 史光华, 史彬林, 等. 柠檬酸对肉仔鸡屠宰性能的影响[J]. 饲料工业, 2010, 31(6):9-11.
 - [10] Al - SADI R, BOIVIN M, MA T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier [J]. Frontiers in Bioscience (Landmark Ed), 2009, 14(7):2765-2778.
 - [11] WIJBURG O L C, UREN T K, SIMPFENDORFER K, et al. Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection [J]. Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(1): 21-26.
 - [12] 朱电锋, 张娅菲, 储小燕. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对断奶仔猪生长性能、血清细胞因子及肠道免疫水平的影响[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(6):1126-1132.

上接第5页

一例田园猫肠道线性异物的诊治

吴志文¹, 黄碧霞², 胡莲美¹, 郭剑英^{1*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 爱诺百思宠物医院叶子分院, 广东 广州 510800)

摘要:猫的肠梗阻是一种肠道机能障碍、导致内容物转运困难的疾病,临床上对机械性梗阻和功能性梗阻的快速鉴别诊断存在一定难度。本病例为一只具有反复呕吐史的田园猫,在拍摄X线平片后未见明显异物,通过腹部B超检查诊断为肠道线性异物,并进行了无菌导尿管引导下的手术治疗。术后运用B超对肠道恢复情况进行监测,诊断胃肠道炎症导致的功能性梗阻并评估了术部肠道的愈合情况,为后续治疗提供依据,预后良好。

关键词:猫; X线; B超; 线性异物

中图分类号:S858.293 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)05-0059-05

Diagnosis and treatment of linear intestinal foreign body in a felis catus

WU Zhiwen¹, HUANG Bixia², HU Lianmei¹, GUO Jianying^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642;

2. Yezi Branch, Ainuobaisi Anima Hospital, Guangzhou Guangdong 510800)

Abstract: Intestinal obstruction in cats is a disease characterized by intestinal dysfunction and difficulty in transporting contents. It is difficult to distinguish between mechanical obstruction and functional obstruction with low opacity. This case was a felis catus with a history of repeated vomiting. No obvious foreign body was found after plain X-ray, and linear intestinal foreign body was diagnosed by abdominal b-ultrasound, and then surgical treatment was performed under the guidance of sterile urethral catheter. Postoperative b-ultrasound was used to monitor the intestinal recovery, diagnose functional obstruction caused by gastrointestinal inflammation and evaluate the intestinal healing at the operative site, providing a basis for subsequent treatment with a good prognosis.

Keywords: Cat; X-ray; Ultrasound; Linear foreign body

肠道线性异物性肠梗阻指误食线性异物引起的肠内容物转运困难,导致消化道完全或不完全等梗阻,临床上以食欲废绝、频繁呕吐和不排便等为特征。可引起电解质和酸碱平衡紊乱,严重者可产生急性腹痛,甚至休克、死亡^[1]。猫误食线性异物在临床上时有发生,该病的临床症状不具有

特异性,很难与其他消化道疾病区分,需要借助X线和B超等影像学技术进行诊断。笔者临床中救治了一例具有反复呕吐史,最终诊断为由缝线导致的机械性肠梗阻的病例,经手术和对症治疗,预后良好。现将其报告如下。

收稿日期:2021-11-24

作者简介:吴志文(1988-),男,兽医师,硕士,研究方向为小动物疾病防治和兽医病原微生物耐药性研究、检测与监控研究。E-mail:scauwuzhiwen@scau.edu.cn

*通信作者:郭剑英(1967-),女,正高级实验师,硕士,研究方向为兽医内科学。E-mail:jyguo@scau.edu.cn

1 病例介绍

患猫约3岁龄,为雄性田园橘猫,体重3.5 kg,体温38.5℃。主诉:最近几天频繁呕吐、食欲废绝,昨天在外院就诊,对症治疗后未再有呕吐表现,但仍无食欲,遂转至我院就诊。

2 检查

2.1 一般临床检查

患猫对外界刺激警惕,呼吸较急促,粘膜颜色粉白,体况评分体系(BCS)6/9,黏膜再充盈时间小于2秒。舌下及口腔未见明显异物,触诊腹部抗拒,无明显异物感。

2.2 影像学检查

腹部X线检查结果见图1、图2,腹腔内脏器位置,体积和形态轮廓等未见明显异常;胃肠道内未见明显高不透明度异物,局部肠段可见轻度充气,未见明显肠道扩张。

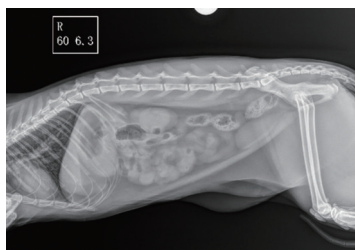


图1 腹部侧位X线平片



图2 腹部正位X线平片

腹部B超检查结果显示,患猫胃部和十二指肠中等量积液(见图3),十二指肠和部分空肠肠道成褶皱状,肠腔内可见一高回声后方无声影的线状物(箭头处),该段肠道肠壁分层可见,蠕动亢进(见图4),肠腔内可见中等量中等回声内容物,排空受阻。暂未见明显的腹腔积液和气腹。

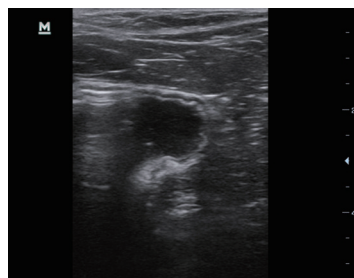


图3 胃部超声图像



图4 肠道超声图像

2.3 实验室检查

血液学检查结果见表1、表2、表3、表4。可见红细胞总数、血红蛋白和红细胞压积升高,生化中尿素升高,肌酐未见明显异常,说明患猫脱水;白细胞在参考范围以内,但总蛋白和球蛋白升高,说明患猫有炎性感染。血气中患猫pH值下降, HCO_3^- 浓度正常, PaCO_2 下降,患猫呼吸急促,提示呼吸性碱中毒;凝血酶源激活时间未见明显异常。

3 诊断与治疗

由X线、B超检查、血液学检查结果,结合病史,初步诊断为线性异物导致的机械性肠梗阻合并肠道炎症。考虑到患猫病程较长,有肠道穿孔等风险,和宠主沟通后对患猫进行体液扩容,行肠道异物取出术。术前使用复方氯化钠250 mL静脉

表1 血常规检查结果

检查项目	单位	检查结果				参考值
		术前	术后第1 d	术后第2 d	术后第3天	
红细胞数(RBC)	10 ¹² /μL	9.59	9.02	8.4	7.31	4.6-10.00
血细胞比容(HCT)	%	50 ↑	48	40	37.3	28.0-49.0
血红蛋白溶度(HGB)	g/dL	162 ↑	150	135	126	93-153
平均红细胞体积MCV	fL	52.2 ↑	51.8	51.5	51.1	39-52
白细胞数(WBC)	10 ⁹ /L	7.8	27.6 ↑	27.4 ↑	21.3 ↑	5.5-19.5
中性粒细胞数(Gran)	10 ⁹ /L	4.8	22.61 ↑	23.6 ↑	17.2 ↑	2.1-15.0
淋巴细胞数(LYM)	10 ⁹ /L	2.5	4.6	3.3	3.6	0.8-7.0
单核细胞数(MONO)	10 ⁹ /L	0.5	0.8	0.5	0.5	0-1.9
血小板数(PLT)	10 ⁹ /L	185	152	155	152	100-514

注: ↑表示超过参考值, ↓表示低于参考值, 下表同

表2 血液生化检查结果

检查项目	单位	检查结果	参考值范围
血糖(GLU)	mmol/L	8.6	4.11-7.95
肌酐(CREA)	mmol/L	145	44-159
尿素(UREA)	umol/L	10.2 ↑	2.5-9.6
磷离子(PHOS)	mmol/L	1.45	0.81-2.2
钙离子(Ca)	mmol/L	2.44	1.98-3
总蛋白(TP)	g/L	96 ↑	52-82
白蛋白(ALB)	g/L	35	23-40
球蛋白(GLOB)	g/L	60 ↑	25-45
丙氨酸转氨酶(ALT)	U/L	57	10-125
碱性磷酸酶(ALKP)	U/L	23	23-212
谷氨酰转氨酶(GGT)	U/L	0	0-11
总胆红素(TBIL)	umol/L	10	0-15
胆固醇(CHOL)	mmol/L	5.6	2.84-8.26
淀粉酶(AMYL)	U/L	2416	500-1500
脂肪酶(LIPA)	U/L	219	200-1800

表4 凝血功能检查结果

检测项目	检查结果	参考值
凝血酶原激活时间PT	8.8	5-16
活化部分凝血活酶时间APTT	35.1	15-43

滴注, 速诺 10 mg/kg 皮下注射, 布托啡诺 0.4 mg/kg 静脉注射。用丙泊酚 4 mg/kg 诱导麻醉后, 对患猫进行气管插管并以异氟烷维持麻醉。患猫呈仰卧位, 常规腹中线切口打开腹腔, 牵引出梗阻的肠

表3 血气检查结果

检查项目	单位	检查结果	参考值
血糖 GLU	mg/dL	108	60-130
尿 BUN	mg/dL	31	15-34
钠离子浓度 Na ⁺	mmol/L	148	147-162
钾离子浓度 K ⁺	mmol/L	4	2.9-4.2
氯离子浓度 Cl ⁻	mmol/L	114	112-129
二氧化碳总量 TCO ₂	mmol/L	22	16-25
阴离子间隙 AG	mmol/L	11	10-27
红细胞压积 Hct	%	47 ↑	24-40
总血红蛋白浓度 Hb	g/dL	16 ↑	8-13
酸碱度 PH		7.501 ↑	7.25-7.4
二氧化碳分压 PaCO ₂	mmHg	27.4 ↓	33-51
碳酸氢根离子浓度 HCO ₃ ⁻	mmol/L	21.4	13-25
实际剩余碱 BE(B)	mmol/L	-7.4 ↓	-7-2.9

段, 肠管颜色正常, 并用浸有温生理盐水的无菌纱布块隔离术部与周围组织。在梗阻肠道末端做一长约 1 cm 的切口, 通过此创口将缝线的尾端牢固的固定在导尿管上, 将绑有缝线的导尿管通过肠道切口向近端肠道移动, 在肠道近端缝线头侧再做一小切口, 抽离导尿管, 取出一条长约 40 cm 的衣服缝线。单层对接缝合肠道, 常规冲洗腹腔后关闭腹腔。

术后第 1d 患猫精神沉郁, 体温正常, 无食欲, 呕吐一次, 呕吐物呈黄绿色液体, 未见排便。腹部超声复查可见腹腔有少量积液, 部分空肠呈小波浪痉挛状影像(见图 5, 箭头处), 十二指肠和手术

空肠段有积液呈中等扩张, 排除肠道缝合处狭窄造成阻塞的可能, 血常规结果显示中性粒细胞总数升高(见表1), 初步判定为肠炎导致功能性梗阻。皮下注射速诺 10 mg/kg、布托啡诺 0.4 mg/kg、阿托品 0.02 mg/kg、复合维生素 B 和 VB₁₂ 各 0.5 mL 用于促进胃肠功能恢复, 静脉输注 150 mL 乳酸林格氏液补充水分电解质和给予肠外营养。

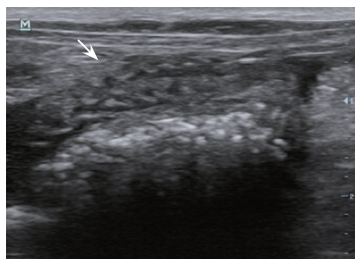


图5 术后第1d部分空肠超声影像

术后第2 d, 患猫未见呕吐, 精神改善, 有正常大便, 但仍然不愿主动进食。腹部超声显示胃部和十二指肠, 及手术段空肠有积液, 积液量与前一天相近。波浪状痉挛段空肠影像消失, 检查肠道缝线位置局部未见肿胀, 缝线段肠道周围未见积液(见图6)。血常规结果以嗜中性分叶粒细胞升高为主(见表1)。维持治疗一天。

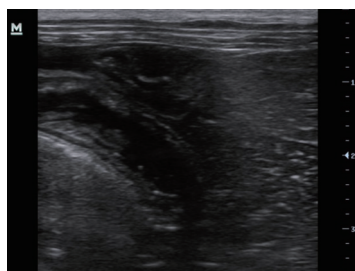


图6 术后第2d部分空肠超声影像

术后第3 d, 患猫精神进一步改善, 未见呕吐, 主动进食少量食物, 血常规结果显示白细胞总数和嗜中性粒细胞数已恢复参考值范围(见表1)。患猫回家自行护理, 次日回访, 食欲、二便恢复正常。于术后第8 d拆线, 恢复良好。

4 讨论

在本病例中, 患猫术前血液学检查白细胞数

正常, 这可能是由于术前患猫处于急性炎症期, 新生成的白细胞被机体快速消耗, 导致白细胞(中性粒细胞)数处在正常参考值范围内。术后前两天白细胞数升高, 术后第三天白细胞数恢复正常, 可能是由于手术和用药维持治疗控制了患猫体内的炎症反应, 机体白细胞消耗量减少, 所以术后开始出现白细胞数短暂升高, 到第三天白细胞数则恢复正常。

当患猫有反复呕吐病史, 则怀疑存在胃肠道梗阻的可能性, 一般我们首选X线检查进行排查, 但本病例中X线检查并未发现明显的肠道异物的影像特征, 可能造成梗阻的异物属于X线可透性异物, 如线性异物; 而猫早期线性异物导致的肠道梗阻通常是半堵塞性的, 使得部分内容物可通过半堵塞的肠道。在消化道异物的案例中, 通常会有肠管扩张, 异物与扩张肠道相连, 远端肠道空虚等特征, 因此X线检查在胃肠道梗阻的诊断上具有快速、便捷等优势^[2]。但是在本案例中患猫大便正常, 如果单纯用X线结果进行诊断容易出现漏诊或误诊, 导致胃肠道长时间受如线性异物的刺激出现严重的机械性损伤, 最终可能引发多肠段全层穿孔, 甚至死亡。有文献报告, 与X线平片相比, 超声能更早的诊断肠道异物, 同时能提示肠道蠕动、扩张、积液等病情变化^[3-4]。本案例中患猫的腹部B超检查提示胃部和十二指肠中等量积液, 十二指肠和部分空肠肠道成褶皱状, 肠腔内可见一高回声后方不带声影的线状物, 该段肠道肠壁分层可见, 蠕动亢进, 肠腔内可见中等量中等回声内容物, 排空受阻, 诊断为线性异物。表明B超联合腹部X线片能提高急性小肠梗阻的正确诊断率^[5]。

在传统肠道线性异物取出手术中, 为避免牵拉异物时出现人为的肠道损伤、穿孔常采用分段式肠切开, 分多次完整取出的异物。据文献报道, 猫肠切开手术的潜在并发症包括手术部位的渗漏, 狭窄和感染, 发生率约为7%-16%, 采用分段式切开的手术方法无疑会增加出现并发症的风险^[6-8]。本案例中采用导尿管引导移除肠道内的线性异物的方式, 不仅可以避免在手术过程中牵拉线性异物时对肠道产生机械性损伤, 而且有效的减少了肠道开口的数量, 对患猫术后肠道功能恢复, 预防术后出现肠道术部内容物泄漏起到了积极的作

用。另据文献肠切开术后并发症常呈急性发病, 临床表现为精神沉郁, 食欲缺失, 呕吐等症状, 如发病时间为术后 24 h 内, 原因常为术部狭窄性肠梗阻^[9]。本案例中患猫术后无食欲, 次日出现呕吐等症状, 腹部超声见腹腔有少量积液, 肠壁分层明显, 部分空肠呈小波浪痉挛状影像, 十二指肠和手术空肠段有积液呈中等扩张, 排除了术部狭窄导致了结构性梗阻的可能, 初步诊断为胃肠道炎症引起的功能性梗阻, 对症治疗后超声复查肠道恢复良好。术后超声复查腹腔积液的变化及肠道形态的变化, 对识别和治疗肠道手术的并发症起到了积极的作用。

5 小结

在小动物临床上, 猫误食线性异物导致肠道出现机械性梗阻的案例较多发, 平时应加强饲养管理, 避免猫单独接触到缝线、线团玩具等异物, 降低出现该病的风险, 若出现食欲下降, 呕吐等症状应及时就医。

参考文献:

[1] 王瑛琪, 罗春海, 武瑞. 一例犬肠道线性异物的诊治[J]. 黑

龙江畜牧兽医, 2018(2):124-126.

- [2] 白涛, 李长安. X线诊断6例宠物犬的肠梗阻[J]. 中国兽医杂志, 2014, (2):64-65.
- [3] 温赐祥, 陈雪松, 梁志勇, 等. 超声、腹部X线平片、CT3种影像检查在肠梗阻诊断中的价值比较[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(4):558-559.
- [4] 银岭. 兽医影像技术在诊断犬肠道内异物性疾病中的对比研究[D]. 硕士学位论文. 华中农业大学, 2007.
- [5] 张庆华, 李燕萍. B超联合腹部平片在急性小肠梗阻诊治中的价值[J]. 中国处方药, 2016, 14(9):136-137.
- [6] RALPHS S C, JESSEN C R, Lipowitz A J. Risk factors for leakage following intestinal anastomosis in dogs and cats: 115 cases (1991 - 2000) [J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2003, 223(1):73-77.
- [7] WYLIE K B, HOSGOOD G. Mortality and morbidity of small and large intestinal surgery in dogs and cats: 74 cases (1980-1992) [J]. Journal of The American Animal Hospital Association, 30 (5):469-474, 1994.
- [8] HAYES G. Gastrointestinal foreign bodies in dogs and cats: a retrospective study of 208 cases [J]. The Journal of Small Animal Practice. 2009, 50(11):576-83.
- [9] ALLEN D A, SMEAK D D, Schertel ER. Prevalence of small intestinal dehiscence and associated clinical factors: a retrospective study of 121 dogs [J]. Journal of The American Animal Hospital Association, 1992, 28(1):70-76.

上接第17页

- 研究进展[J]. 纤维素科学与技术, 2021, 29(4):61-67.
- [7] 李巧凤, 罗雪菲, 何颂华, 等. 纤维素酶联合微波提取石崖茶中黄酮类成分的工艺优化及其成分表征[J]. 食品工业科技, 2020, 6(41):15-22.
- [8] LIANG X, WENJIA H, MEI L, et al. Enzyme-assisted ultrasonic-microwave synergistic extraction and UPLC-QTOF-MS analysis of flavonoids from Chinese water chestnut peels [J]. Industrial Crops & Products, 2018, 117: 179-186.
- [9] 吴淑清, 艾丛苹, 栾茗然, 等. 复合酶协同超声辅助提取东北土当归叶中总黄酮及其抑菌活性的研究[J]. 江苏调味副食品, 2021(3):37-40.
- [10] ZHAORUI M, ZHAO J, DUAN H, et al. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from Pollen Typhae by

ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 161:246-253.

- [11] 黄文睿, 唐超凡, 陶雨峰, 等. 绿色低共熔溶剂提取野菊花中黄酮类化合物[J]. 精细化工, 2022, 39(3):569-576.
- [12] 崔建强, 问娟娟. 响应曲面法优化微波提取花生壳中总黄酮工艺研究[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(2):16-19, 25.
- [13] 刘志聪, 郑丹萍. 微波辅助法提取潮州柑橘皮中总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(23):188-191.
- [14] 陈晓琪, 李瑶晨, 李璐瑶, 等. 黄秋葵中黄酮类化合物提取方法优化及总黄酮抑菌效果研究[J]. 核农学报, 2022, 36(3):0669-0679.
- [15] 张丽君, 李敏, 王静, 等. 石榴皮中黄酮类物质的提取及抗氧化研究[J]. 化学工程师, 2021, 9:65-68.

一例犬乳腺肿瘤的诊治

张志宏¹, 周方军², 李雄剑², 何连有², 丘倬希^{1*}

(1. 江门市动物疫病预防控制中心, 广东 江门 529000;

2. 江门市五邑宠物医院, 广东 江门 529000)

摘要:对一例单侧乳腺多发性团块的6岁未绝育的贵宾母犬进行临床检查、血常规和血液生化检查、腹部超声以及胸片检查后,为该犬实施了单侧乳腺全切术,并对术中切除的肿物及相关淋巴结进行了病理切片检查;诊为恶性混合瘤。本文对该进行了总结,以期对乳腺肿瘤的临床诊治提供一定的参考。

关键词: 乳腺肿瘤; 乳腺全切术; 病理切片; 恶性

中图分类号: S858.292 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)05-0064-04

Diagnosis and treatment of a canine breast tumor

Zhang Zhihong¹, Zhou Fangjun², Li Xiongjian², He Lianyou², Qiu Zhuoxi^{1*}

(1. Jiangmen Animal disease control center, Jiangmen Guangdong, 529000;

2. Jiangmen Wuyi Pet Hospital, Jiangmen Guangdong, 529000)

Abstract: After clinical examination, blood routine and blood biochemical examination, abdominal ultrasound and chest X-ray examination of a 6-year-old non neutered female poodle with unilateral multiple breast mass, a unilateral total mastectomy was performed for the dog, and the tumor and related lymph nodes were examined by pathological section. It was diagnosed as malignant mixed tumor. This paper summarizes this disease in order to provide some reference for the clinical diagnosis and treatment of breast tumors.

Keywords: Breast tumor; Total mastectomy; Pathological section; Malignancy

乳腺肿瘤是未绝育母犬最常见的肿瘤,约占母犬全部肿瘤的42%,其中约有50%的犬乳腺肿瘤为恶性肿瘤,并且有一半左右在初次诊断时已经发生转移。性激素在母犬乳腺肿瘤的发展中起到了重要作用,肥胖也是患乳腺肿瘤的一个因素^[1]。当前,手术是治疗犬乳腺肿瘤的主要手段^[2]。

1 病例概况

贵宾母犬,6岁,未绝育、未生育,驱虫疫苗接种情况不详,以全价犬粮为主要营养来源。该犬腹部皮下近半年内逐渐出现一些小的硬块,生长速度

慢,无搔痒,平常发情周期有规律,其它未见异常。

2 临床检查

患犬体重(BW)5.7 kg,体温38.6℃,呼吸32 beat/m,心率93 bit/m,少量牙结石,听诊心肺音未见明显异常。该犬共有4对乳腺,第三对及以下的乳腺周围皮肤可见大量的粉刺,右侧第三、第四个乳腺周围有硬块,大小不等,介于0.8~2 cm。硬块形状不规则,触摸无触感。

收稿日期:2021-11-12

作者简介:张志宏(1970-),男,本科,高级兽医师,从事动物疫病防控与诊治相关工作。E-mail:395986818@qq.com

*通讯作者:丘倬希(1989-),男,本科,兽医师,从事动物免疫与疫病防控相关工作。E-mail:180056613@qq.com

3 实验室检查

在患犬后肢隐静脉进行采血,使用肝素锂抗凝管进行保存。进行了血常规、血液生化及凝血功能的检测。

3.1 血常规

血常规检查各项指标正常。

3.2 血液生化检查

血液生化检查各项指标正常。

3.3 凝血功能检查

血液凝血功能检查结果如表1所示,结果均在参考范围内,表明血液凝血功能各项指标正常。

表1 血液凝血功能检查结果

检测项目	单位	检查结果	参考值范围
活化部分凝血活酶时间	s	197.8	145-316
凝血酶原时间	s	8.1	7~22
凝血酶时间	s	22.5	10-39.5
纤维蛋白原	mg/dL	319	155~375

3.4 胸部影像DR检查

患犬仰卧体位进行DR检查,结果如图1图像所示,左右肺叶纹理清晰,心脏轮廓光整,无团块影像,未见其他明显可疑影像。患犬左侧卧体位进行DR检查,结果如图2图像所示,肺门处无肺泡症,无团块影像,未见其他明显可疑影像。



图1 仰卧位影像图

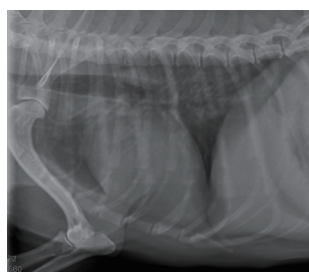


图2 左侧卧位影像图

3.5 腹部影像超声检查

患犬仰卧保定,腹部从肋弓至最后一对乳腺处剃毛,均匀涂抹耦合剂,用小凸阵及线阵探头进行扫查。子宫未见明显扩张,腔内无积液;双侧卵巢大小均约为1.0 cm×0.8 cm,右侧卵巢实质内可见一占位性低回声无包膜囊性结节,大小约为0.3 cm×0.4 cm;腹腔里多对

淋巴结均未发现异常。发现乳腺团块,团块大小不等,实质均质,包膜与周边组织分界不清,实质内可见丰富的血流信号,如图3示。

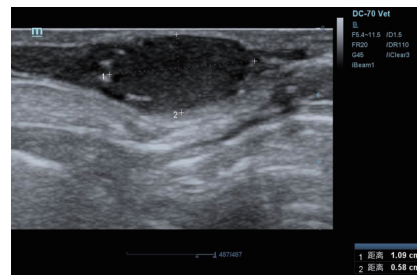


图3 乳腺团块超声图

4 治疗

根据临床检查、血细胞检查、生化检查、影像学检查的结果综合分析,且患犬体况良好,未发现胸腔与腹腔内可疑的增生物或团块,确认为乳腺增生物,性质未明,建议进行单侧全乳腺切除及子宫卵巢切除术,经主人同意后进行手术。

4.1 术前准备

术前禁食禁水10 h,术前静脉留置针。进行术前补液,预防性的注射止血、止痛及消炎药物。对患犬进行备皮、腹部从前肢腋下至耻骨前剃毛,将皮肤清洁干净。手术室进行紫外线消毒,手术器械进行高压消毒,同时准备好急救药品。

4.2 麻醉与保定

采用吸入麻醉的麻醉方式。首先经留置针缓慢推注丙泊酚3.5 mL,待患犬进入镇静状态,进行气管插管,固定好插管,联接麻醉机与氧气,异氟烷维持麻醉;联接监护仪,监测动物术中的血压,血氧浓度及心率。患犬仰卧保定,术部由里到外用碘伏消毒,再用酒精脱碘,反复3次,覆盖创巾。

4.3 手术过程

沿脐部腹中线向下切开皮肤,分离皮下组织

至筋膜,切开腹中线打开腹腔,勾出子宫与卵巢,切断卵巢悬吊韧带,结扎卵巢动静脉后把卵巢与动静脉切断,分离子宫韧带,小心避开输尿管,结扎子宫体,把子宫卵巢完整的取出,用简单连续缝合腹腔肌肉及腹膜。

沿着之前切开的皮肤环绕乳腺外1 cm处切开皮肤,用止血钳分离皮下组织;胸部腺体附着于胸肌上,之间只有少量脂肪及结缔组织,尽量完整的把乳腺分离出来,结扎给乳腺供血的血管,用温生理盐水湿润的纱布覆盖在胸部暴露的组织上;继续分离至鞘状突起区域,用纱布轻捋乳腺与腹部筋膜间结缔组织完整的把腹部乳腺分离,小心将腺体用纱布反转至尾侧,暴露出腹股沟管、外阴动脉和外阴静脉阴部大神经及鞘状突起,结扎该处的血管进行结扎、切断。用组织钳夹住鞘状突起,在其基部结扎、切断。至此乳腺完整的分离出来,用3-0PGA圆针进行皮下组织缝合,使用步履式缝合法。用3-0PGA棱针进行皮肤的减张缝合。减张缝合法选用了交叉缝合法及间断结节缝合法交替缝合皮肤,皮肤闭合后用碘伏消毒,贴上灭菌辅料贴。关闭麻醉药,保持通氧,直至患犬出现呼吸加快及咳嗽反应,再把气管插管拨除。

4.4 术后护理

把患犬移至住院部后,穿上网状紧身手术衣。保温灯保温,输液促进循环代谢,术后10 h后恢复进食及进水。术后连续输液3天,使用药物有:生理盐水、头孢噻唑钠、维生素C、美洛昔康、复合维生素B。

患犬术后第一天开始饮水及进食少量处方罐头,术后第二天精神良好,食欲与术前无异,正常排尿排便,术后第四天出院。术后14天(图4),创口干燥,无红肿,愈合良好,术后15天拆线。



图4 创口愈合图

5 病理切片检查

对术中切除的肿物及相关淋巴结病的理切片

进行镜下检查,显示乳腺组织结构紊乱,大量增生的细胞呈团状或梭状排列,细胞质不明显,胞核蓝染,局部有坏死,有少量炎性细胞浸润。组织学恶性分级1级:肿瘤组织内75%以上样本形成腺管样结构;瘤细胞核大小、形态一致,胞核形状规则,染色质细腻(见图5)。病理诊断为恶性混合瘤。

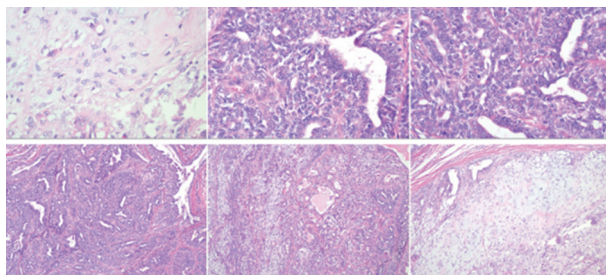


图5 乳腺病理切片图

6 讨论

随着宠物老龄化的加剧,乳腺肿瘤疾病成为临床常见病,但几乎所有的乳腺肿瘤(99%)均发生于未去势的雌性,其中大多数的乳腺肿瘤发生在中年或老年动物上,6岁以上的宠物乳腺肿瘤的发生率明显增高,幼龄动物较少见。其中,35%~50%的犬乳腺瘤为恶性,90%的猫乳腺瘤为恶性^[2]。目前手术切除仍然是治疗乳腺肿瘤的金标准。

切除方法有头侧乳腺群切除、尾侧乳腺群切除,单侧乳腺群切除。犬有4~5对乳腺,因为在乳腺的中央部分布有流向头侧及尾侧的淋巴管通路,而其它的乳腺淋巴管走向头侧或者尾侧。在进行头侧或尾侧乳腺群切除时,要连同中部的乳腺一同切除。而中部分生肿瘤时,应进行单侧乳腺全切。而对猫的乳腺肿瘤则建议进行单侧全切^[3]。乳腺肿瘤最容易转移到附近的淋巴结以及肺脏,手术前一定要拍摄胸片和检查体表淋巴结。

本病例为单侧多个乳腺发生肿瘤,且瘤体直径均未达3 cm,经临床检查未发现明显转移现象,符合手术条件。手术采取了母犬绝育和单侧乳腺全切的治疗方式。手术应注意:(1)先进行绝育手术,避免肿瘤转移到腹腔;(2)尽可能完整切除乳腺组织及腹股沟淋巴结;(3)皮肤及皮下组织的大面积切除,引起皮肤张力过大、皮下形成空腔后组织渗出液蓄积其中导致创口愈合不良。因此使用

步履式缝合,皮肤的缝合采用了交叉缝合和简单结节缝合,术后配合网状弹性手术衣压迫。手术闭合时评估张力,如果张力过大无法闭合创口,要进行有血管的带蒂网状成形术。如果术后出血,皮下血肿,可进行穿刺抽吸。

对本病例术后连续三年跟踪,通过定期临床检查,实验室检查,影像检查等,均未发现复发及转移的情况,患犬现生活状态良好,笔者认为属于临床治愈。

7 小结

乳腺癌形成的原因目前还不清楚,相关文献报道在初情期之前进行绝育,可以防止大多数与激素相关的乳腺肿瘤的发生。所以作为临床兽医

师,应科学普及提倡初情期前绝育,对未绝育动物建议定期进行体检,以便早发现乳腺肿瘤,及早进行外科切除仍然是乳腺肿瘤的常用治疗手段,手术尽量完整的切除乳腺及瘤体组织同时进行绝育。目前对于乳腺肿瘤使用药物治疗的效果没有临床数据可提供参考,化疗可能有利于控制肿瘤的发展,这些仍需要在临床上不断探索。

参考文献:

- [1] 何英,叶俊华.宠物医生手册[M].第2版.沈阳:辽宁科学技术出版社,2009,661-662.
- [2] 张海彬,夏兆飞,林德贵.小动物外科学[M].第2版.北京:中国农业大学出版社.2007,613-617.
- [3] 任晓明.图解小动物外科技术-软组织外科、整形外科及齿科[M].第2版.北京:中国农业大学出版社.2009,401-404.

上接第45页

- molasses and monensin in alfalfa hay- or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by Holstein cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(1): 270-285.
- [23] 陈鑫珠,庄益芬,张建国,等.生物添加剂对水葫芦与甜玉米秸秆混合青贮品质的影响[J].*草业学报*,2011,(6):195-202.
 - [24] 庄益芬,张文昌,张丽,等.添加剂对水葫芦青贮品质的影响[J].*中国农学通报*,2007,23(9):2.
 - [25] HONTIVEROS G J S, SERRANO A E, Jr. Nutritional value of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaf protein concentrate for aquafeeds[J]. *Aacl Bioflux*, 2015, 8(1): 26-33.
 - [26] 吕富,茅玲燕,季涛,等.水葫芦叶蛋白提取工艺初步研究[J].*盐城工学院学报(自然科学版)*,2013,26(1):10-13.
 - [27] MEDEIROS R M L, SABAA SRUR A U O, ROQUETTE PINTO C L. A biomass study of water hyacinth for production of protein concentrate [M]. Van Nostrand Reinhold Co., 1999: 226-230.
 - [28] 颜京松,李梅姿.论凤眼莲的是非功过[J].*城市环境与城市生态*,2007,(1):1-4.
 - [29] 王维新,白燕,侯文久,等.凤眼莲在刺参饲料中的应用研究[J].*粮食与饲料工业*,2013,12(8):51-54.
 - [30] 纪苗苗.青贮水葫芦作为反刍动物饲料的研究[D].硕士学位论文.杭州:浙江大学,2010.
 - [31] 白云峰,周卫星,严少华,等.水葫芦青贮条件及水葫芦复合青贮对山羊生产性能的影响[J].*动物营养学报*,2011,23(2):330-335.
 - [32] 黄伟,韩亚平,王桂瑛,等.水葫芦渣与玉米粉混合青贮料饲喂山羊的试验研究[J].*中国畜牧兽医文摘*,2013,(7):10-13.
 - [33] VASCONCELOS G A D, VÉRAS R M L, SILVA J D L, et al. Effect of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hay inclusion in the diets of sheep [J]. *Tropical Animal Health & Production*, 2016, 48(3): 539-544.
 - [34] 白云峰,朱江宁,严少华,等.水葫芦青贮对肉鹅规模养殖效益的影响[J].*中国家禽*,2011,33(7):49-50.
 - [35] 白云峰,蒋磊,高立鹏,等.水葫芦青贮日粮对扬州鹅生长性能、屠宰性能及消化道发育的影响[J].*江苏农业学报*,2013,29(5):1107-1113.
 - [36] 傅智慧.人工湿地生态工程净化养鸭废水的研究[D].硕士学位论文.杭州:浙江大学,2007.
 - [37] 杨海,刘华,王芳宇,等.不同水葫芦饲料配比对攸县麻鸭生产性能的影响[J].*广东农业科学*,2014,41(5):170-172.
 - [38] 谢萍,周学文,杨家雄,等.滇池凤眼莲饲喂肉仔鸡试验的研究[J].*饲料工业*,1999,(4):26-28.
 - [39] 谢萍,周学文,杨家雄,等.生长育肥猪饲喂滇池凤眼莲的饲养试验[J].*饲料博览*,1999,(6):23-25.
 - [40] 崔立,肖怀平,陈鲁勇,等.淀山水葫芦用于饲喂生长育肥猪的效果研究[J].*饲料工业*,2004,25(3):39-40.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.05.14

兽医实验室ELISA检测中常见问题的探讨

黄丽菊, 何奇松, 蓝惠华, 黄胜斌, 周庆安, 韩银华*
(广西壮族自治区动物疫病预防控制中心, 广西南宁 530001)

摘要:兽医实验室中血清抗体的检测主要采用ELISA检测方法, 本文结合兽医实验室的实际操作总结对日常ELISA检测中常出现的问题进行探讨, 发现ELISA检测中常见问题的影响因素包括样品的处理、实验操作方法、实验仪器设备等。提示在兽医实验室检测中必须严格掌握ELISA操作方法, 减少或避免因操作失误而导致的实验失败, 本文可为兽医实验室同行提供帮助。

关键词:ELISA检测; 兽医实验室; 问题; 探讨

中图分类号:S851.34 **文献标识码:**B **文章编号:**1005-8567(2022)05-0068-03

Discussion on common problems in ELISA test in veterinary laboratory

Huang Liju, He Qisong, Lan Huihua, Huang Shengbin, Zhou Qingan, Han Yinhua*
(Animal Disease Prevention and Control Center of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning Guangxi, 530001)

Abstract: The detection of serum antibodies in the veterinary laboratory mainly adopts the ELISA detection method. This paper discusses the common problems in the daily ELISA test based on the actual operation summary of the veterinary laboratory. It is found that the influencing factors of the common problems in the ELISA test include sample processing, experimental operation methods, experimental equipment, and so on. It is suggested that the ELISA operation method must be strictly mastered in veterinary laboratory testing to reduce or avoid experimental failures caused by operational errors. This article can provide help for veterinary laboratory colleagues.

Keywords: ELISA detection; Veterinary laboratory; Problem; Discussion

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 是酶联免疫吸附实验的简称, 是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面, 使酶标记的抗原抗体反应在固相表面进行的技术。该技术可用于检测大分子抗原和特异性抗体等, 具有快速、灵敏、简便、载体易于标准化等优点。在兽医实验室中, ELISA检测的项目很多, 日常检测主要包括猪瘟抗体、蓝耳病抗体、伪狂犬gB和gE抗体以及口蹄疫

(O型、A型和亚洲I型)抗体, 其他的还有小反刍兽疫、马传染性贫血等抗体检测。结合日常ELISA检测过程中遇到的问题, 提出以下注意事项。

1 试剂盒的处理

实验操作人员接收试剂盒后要检查试剂盒外包装是否完好, 确保试剂盒是尚未使用过的。检查生产批号及有效期并记录试剂盒的接收日期和

收稿日期:2021-08-18

基金项目:2020年广西广西农业科技自筹经费项目(Z202034)

作者简介:黄丽菊(1994-), 女, 助理兽医师, 主要研究方向:动物疫病诊断。E-mail:2515906985@qq.com

*通讯作者:韩银华(1986-), 女, 兽医师, 主要研究方向:动物疫病诊断。E-mail:751212813@qq.com

数量, 查看试剂盒的保存方法; 打开试剂盒检查内容物是否完整, 如有遗漏需联系厂家补发, 以免影响实验进展。试剂盒内容物一般包括抗原包被板、阳性对照、阴性对照、酶标抗体、底物液 A 和 B、样品稀释液、终止液、浓缩洗涤液和血清稀释板, 按照先进先出的原则使用试剂盒, 不同批次的试剂盒不能混合使用^[1]。

2 实验用耗材的准备

实验开始前应将要用到的实验耗材准备好, 避免实验过程中找不到或寻找耗材耽误加样而影响实验结果。

2.1 防护装备

口罩、实验服、手套、鞋套、一次性防护帽等在进入实验室前就应该穿戴好。

2.2 加样槽

使用之前进行标记, 不要混用, 特别是酶标二抗反应液、底物、底物液和终止液要标记清楚。或者每次使用前套一个一次性手套, 每次加完试剂都丢掉。

2.3 血清稀释板

试剂盒配套或自购, 切勿使用 PCR 反应板和 ELISA 反应板, 因为二者有较大的吸附性。

2.4 盖板或封板膜

试剂盒配有封板膜或采用血清稀释板的盖板。

2.5 计时器

准确记录实验孵育时间, 及时提醒进行下一步操作。

2.6 暗盒

加显色液后盖住 ELISA 反应板, 室温显色的也可以直接放进实验桌抽屉里。

2.7 移液器

准备好单道和 8 道不同量程的微量移液器以及相配套的吸头。

2.8 洗板设备

准备洗板机或者手动洗瓶、蒸馏水或去离子水、吸水纸或吸水毛巾。

2.9 记号笔

记号笔用于多块 ELISA 反应板同时进行检测时的标记、同一块反应板不同板条的标记以及不同试剂使用加样槽的标记等。

3 ELISA 操作

3.1 ELISA 操作前的准备

试剂盒组分的回温; 仔细阅读实验操作说明书, 严格按照说明书进行实验操作; 记录实验室的温度和湿度; 确认 ELISA 检测试剂盒的反应温度, 需要 37 °C 恒温孵育的要提前打开温箱; 浓缩洗涤液的稀释备用。

3.2 样品的处理

样品是血清, 避免使用严重溶血、胶状和脂状的血清样品, 以免影响实验结果。

3.3 样品的保存

血清存储在 2-8 °C 不能超过 3 d, 若需要更长时间的保存则应存放于 -20 °C 或更低温度的冰箱^[2]。避免反复冻融血清样品, 且冻融血清样品的混匀也应注意避免剧烈震荡。血清样品在保存中如果出现污染所致的混浊或絮状物时, 需离心沉淀后再取上清液进行检测。

3.4 样品及其它试剂的配制

3.4.1 样品的制备

部分检测试剂盒需要稀释血清样品, 严格按照说明书上实验要求使用的浓度进行样品稀释, 常见的有 1:2、1:5、1:40、1:100 稀释等。1:2、1:5 稀释均可以直接在 ELISA 反应板中稀释, 其他稀释倍数高的需要在血清稀释板中稀释第一步, 再转移到 ELISA 反应板中稀释再次稀释至实验所需浓度。比如 1:100 稀释(两步进行: 血清稀释板中进行 1:50 稀释, ELISA 反应板中进行 1:2 稀释)。

3.4.2 洗涤液的配制

按照检测试剂盒说明书要求进行稀释, 常见的有 10 倍、20 倍和 25 倍稀释, 在稀释之前如果浓缩洗液有结晶, 需等结晶融化后混匀再量取洗液进行稀释。

3.4.3 阴阳性对照的处理

按照检测试剂盒说明书要求进行稀释, 个别试剂盒要求在实验前对阴阳性稀释再使用, 大部分试剂盒提供直接适用的浓度。

3.5 加样

在 ELISA 中操作最多的是加样, 涉及实验每一步骤。加样一般都使用微量加样器, 目前使用最多的是移液器, 在使用移液器前检查移液器的吸

头,确保移液器可正常使用以免造成取样不精准而导致实验结果有误差。按照实验需要调好移液器量程,确保移液器吸头与枪头紧贴无松动,加样时将枪头贴着板孔底部,避免加在孔壁上,轻轻打入试剂防止溅出污染其他板孔,加样时尽量避免产生气泡^[3-4]。

3.6 孵育反应

孵育反应是影响测定结果的一个重要因素,这一步也是ELISA实际操作中容易出现问题的地方。孵育时应将反应板用封板膜封住(操作时小心,避免液体溅出)或用盖板盖好。室温孵育时,应保证温度在20~25℃,不应超过25℃,避免把反应板放在阳光下或空调风口处;37℃孵育时应保证足够的反应时间。多板反应时,不能将反应板叠放,以免反应板之间受热不均匀。

3.7 控制反应时间

多块ELISA反应板的操作尽量保证每个反应板的反应时间相同。

3.8 ELISA反应板的洗涤

3.8.1 手工洗板

洗板之前标记好每个板条,尤其是可拆ELISA反应板,以免在洗涤过程中ELISA反应板脱落造成实验样品混乱而导致实验结果不可靠。洗板时,彻底甩掉反应孔中的液体,在吸水纸上拍干,加入下一试剂前避免孔干燥。

3.8.2 洗板机洗板

检查洗板机的性能,清洗洗板机并保持清洁,核对洗涤液内容物以确定洗涤剂的数量。

3.9 读板及数据管理

参照酶标仪厂家的说明书。选择实验要求的波长,在加入终止液后要尽可能快地进行读数(提前打开酶标仪并选好模板),及时保存结果并详细记录。

4 ELISA操作常见问题分析

4.1 实验的必要条件

4.1.1 实验前的充分准备

实验耗材的准备,实验防护装备的准备。

4.1.2 优质的试剂

必须保证实验用试剂在有效期内且试剂没有因保存不当而发生变质现象。

4.1.3 良好的仪器

实验过程中所使用的仪器需定时定期进行校准,使用前检查仪器是否可以正常运行。

4.1.4 正确的实验操作

实验前认真阅读说明书,清楚了解每个实验操作步骤的要求,严格按照要求进行操作,正确的实验操作是保证ELISA检测结果准确的必要条件。

4.2 ELISA检测中常见的问题

4.2.1 OD值偏高或偏低

造成ELISA检测结果OD值偏高的因素包括实验室温度过高、配置试剂或洗液使用的蒸馏水的水质、洗涤次数不足造成试剂残留、底物溶液配制不均匀或长时间暴露在空气中、显色时间过长、酶标仪读数时ELISA反应孔内有气泡等。

造成ELISA检测结果OD值偏低的因素包括实验室温度过低、孵育时间不足、洗涤次数太多、试剂盒试剂过期或有变质、对照样品稀释不当、显色时间太短等。

4.2.2 无颜色产生

加入底物溶液显色反应后ELISA反应板无颜色变化,考虑血清样品是否加入反应板中,试剂添加顺序是否准确,试剂加入量是否正确,酶标记物是否变质失效。

5 小结

综上,在兽医实验室ELISA检测中需要注意的问题很多。因此,为了确保ELISA检测的准确性和实验结果的科学有效性,在ELISA检测操作前必须认真阅读实验操作说明书,做好实验前准备工作,严格按照实验说明书进行操作,在操作过程中时刻注意ELISA检测中有可能出现的问题,减少或避免因操作失误而导致的实验失败。

参考文献:

- [1] 张红燕. 兽医实验室检测管理要点[J]. 畜牧兽医科学, 2020, 22:98-99.
- [2] 布丽布丽·卡里哈提. 兽医实验室抗体检测结果影响因素及对策[J]. 畜牧兽医科学, 2020, 12:24-25.
- [3] 曲百友, 王剑. 兽医实验室ELISA检测中应注意的问题[J]. 山东畜牧兽医, 2014, 5:66.
- [4] 于丹. 兽医实验室ELISA检测中应注意的问题[J]. 当代畜禽养殖业, 2016, 12:63-64.