

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Feb.2014 Volume 39,Number 1 (Total No.173)

Main Content

- Review and Outlook of Pig Market in China* Yu Hua(1)
- Research Development in Water-Holding Capability of Freezing Fresh Meat*
.....Xian Liquan,Dong Xiaoying,et al(4)
- Effects of Feed Lipase on the Production Performance of Laying Hens* Zhang biqian, Li xuehai(7)
- The Effects of Season Chang on Faecal Output and Pollutant Excretion in Growing Cow*
.....Zhang Zhenwei, Pang Weiyong, et al(10)
- Effects of Kumu Herbal Preparations on Performance in Piglets* Li Guozhu,Chen yin(13)
- Comparation of Three Methods for Detection of Antibodies to H₁N₁ Swine Influenza Virus*
.....Yang Qian, Chunyi Xue, et al(16)
- Helminthicide Effects of Insect Repellent in Whole Red-crowed Cranes Herd*
.....Liang Jinhua,Xian Yongjie(21)
- Detection of Clenobuterol Hydrochloride Residues at Basic Level* Fan Ruihuan,Luo Yingjiao,et al(23)
- Establishment and Application of RT-PCR Method for Detection of NDRV*
.....Kong Feng, Yuan Yuanhua, et al(24)
- Development of a Real-time PCR Assay for Detection of Porcine Circovirus Type 2*
.....Ao Yanhua,Mu Guanghui, et al(28)
- Effects of Cumulus Cells on in Vitro Maturation,Fertilization and Embryo Development of Procine Oocytes*
.....Shi Junsong,Luo Lvhua, et al(32)
- Applications of Soybean Lecithin in Dog Feeds* He xiaojun,Yu Dandan, et al(36)
- Using Rules of Glucocorticoids in Pets Veterinary Practice*Liu Jianhong,Zhang Shanchai(41)
- Surveys of Demands of animal Husbandry and Veterinary Technical Graduate from Secondary Vocational
Schools*Chen Qiong,Liu Hexiang,et al(44)
- Causes and Countermeasures of Abortive FMD Immunization*Huang Wangshi,Nu Yingran,et al(50)



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

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

2013年我国生猪市场回顾及2014年形势展望

虞 华

(国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005)

摘 要: 2014年初的现状使得部分养猪人对后期生猪市场信心明显不足。在需求已经逼近最高峰的情况下, 猪价仍是如此疲软, 折射出总存栏已经处于非常高的水平。如果春节后需求大幅回落, 猪价极有可能像2013年一样出现春节后下跌; 而2014年猪价总体走势仍将震荡向上, 猪价浴火重生或在2014年下半年。全年价格中枢应比2013年明显抬高。同时, 全球玉米、大豆产量大幅增加, 在供给端的压力、下游深加工需求疲软的助推下, 玉米、豆粕价格未来保持弱势下跌格局的可能性较高。生猪养殖业未来有望延续“猪价稳步上移, 饲料成本下降”的最佳状态。

关键词: 2014; 中国; 生猪价格; 走势分析

中图分类号: S828 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0001-03

随着新年的到来, 广大养猪户最关注的莫过于2014年生猪价格走势。现阶段南方“暖冬”压力较大, 无法全面带动猪价消费, 东北华北地区疫情也引起当地的抛售, 青海、新疆等局部地区“向市场投放冻储猪肉”的消息, 对养殖户来说也不是利好因素, 加上部分养殖户还在压栏想集中到过年前后的关键几天出栏, 这样的行情让部分养猪人对后期生猪市场明显信心不足, 不敢对2014年1月份猪价能涨到一个高峰报以高期待。1月2日全国生猪价格最高地区为贵州省, 生猪平均价为16.03元/kg; 最低地区为黑龙江省, 生猪平均价为13.85元/kg; 全国生猪平均出场价格为14.96元/kg, 全国大部分地区生猪行情都在震荡调整。近期生猪市场的走势可以看出, 生猪销售方面形势非常不乐观。在需求已经逼近最高峰的情况下, 猪价仍是如此疲软, 折射出总存栏已经处于非常高的水平。

1 2013年国内生猪市场价格变动总体特点

2013年的养猪行业, 或许变化多于稳定, 失望多于惊喜, 收获大于付出。现在虽然猪价依旧不是人们想象中的“高高在上”, 但是头均盈利也有上百元。

1.1 猪价和肉价两头高、中间低, 走势形同

2010年

猪价监测资料显示: 2013年全国生猪平均出场价格为14.74元/kg, 比2012年同期的14.44元/kg高0.30元; 全年均价最高的月份是1月份, 达17.16元/kg; 全年均价最低的月份是4月份, 仅12.30元/kg。2013年1-4月份全国生猪出栏平均价由高峰时的17.42元/kg跌至4月30日的12.11元/kg, 价差达到5.31元, 跌幅超过30%。在国家两次收储冻猪肉影响下, 5月份以后, 全国猪价连续4个多月出现回升(图1), 9月10日全国生猪平均出场价格已回升至15.82元/kg, 后在15.5元/kg上下震荡。与此同时, 全国猪肉零售价格由年初高峰时的25.32元/kg下降至4月30日的19.04元/kg左右, 价差达到6.28元, 降幅约为25%, 肉价一度跌回到2010年10月底的水平。2013年全国猪肉平均零售价格为22.17元/kg, 比2012年的24.96元/kg便宜2.79元; 1月份均价最高, 达24.97元/kg; 5月份均价最低, 仅19.50元/kg(图2)。

1.2 平均猪粮比价明显高于盈亏平衡点

2013年全国平均猪粮比价为6.31:1, 高于盈亏平衡点, 比2012年的6.03:1高了0.28, 仍是一个赚钱的年份(图3)。猪粮比价最高的月份是1月份, 达7.40:1; 猪粮比价最低的月份

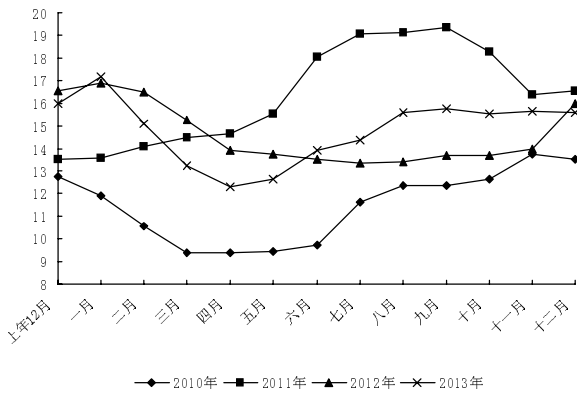


图1 2010-2013年全国生猪价格走势(元/kg)
注:生猪价格数据来源于华夏养猪网

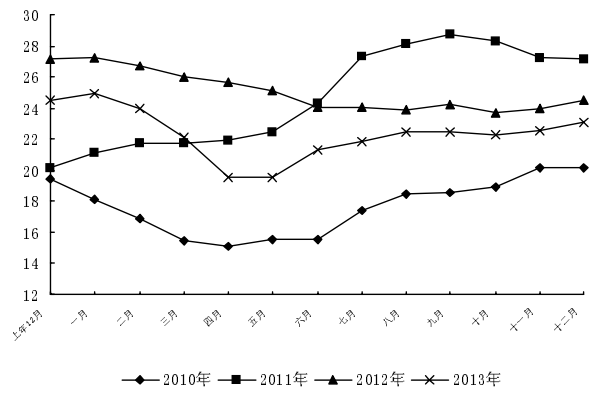


图2 2010年以来全国猪肉价格走势(元/kg)
注:猪肉价格数据来源于神农网

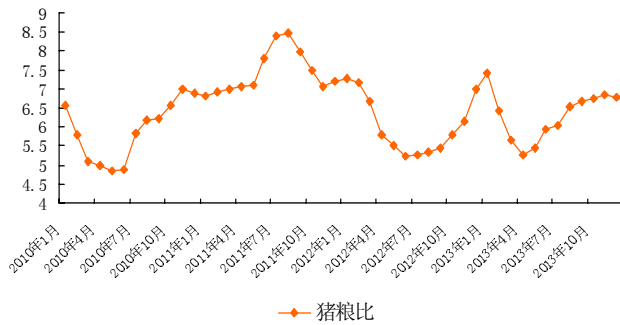


图3 2010年以来猪粮比价走势
注:基础数据来源于华夏养猪网

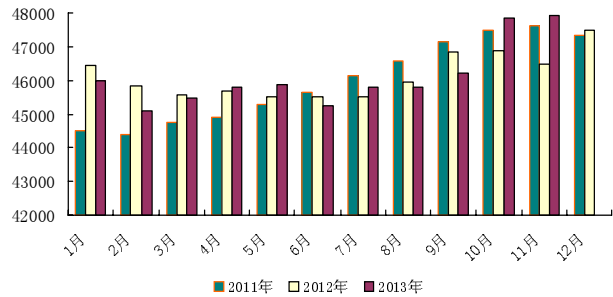


图4 2011年以来各月份全国生猪存栏数比较(万头)
注:数据来源于中国农业信息网和国家统计局网

是4月份,仅5.28:1。

1.3 生猪和能繁母猪存栏量处于较高水平,总体产能偏高

根据国家统计局2013年10月份发布的数据显示,2013年9月底生猪存栏47541万头,同比增长1.5%(图4)。2013年12月16日,农业部公布了2013年11月份4000个监测点生猪存栏信息,11月生猪存栏较上月增加0.2%,比2012年同期增加0.7%。其中,能繁母猪存栏较上月减少0.5%,较2012年同期减少2.3%(图5)。生猪和能繁母猪存栏水平均处于较高水平,能繁母猪虽有减少,但并未出现大规模淘汰母猪现象,总体产能仍然偏高。

1.4 饲料价格仍在高位运行

2013年全国玉米价格平均为2.34元/kg,比2012年的2.41元/kg便宜0.07元;2013年全国豆粕价格平均为4.17元/kg,比2012年的

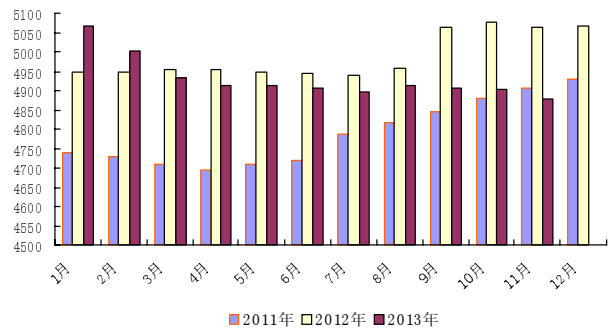


图5 2011年以来各月份全国能繁母猪存栏数比较(万头)
注:数据来源于中国农业信息网

均价3.83元/kg高0.34元。2012年国内玉米、豆粕等饲料原料价格逐月上涨并于6月和9月分别创下历史高位后有所回落,但目前仍处于较高水平(图6)。2013年12月30日,玉米价格为2.30元/kg,与年初同期基本持平;豆粕价格为4.16元/kg,比年初上涨3.5%,同比上涨0.7%。

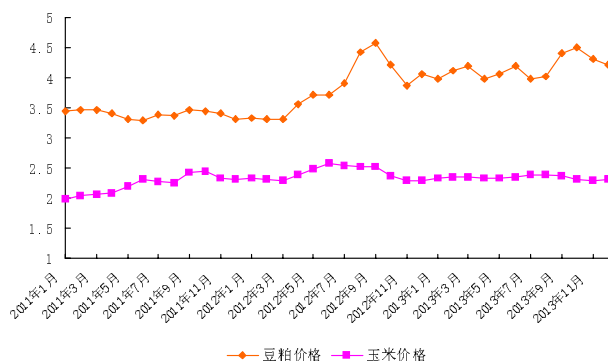


图 6 2011 年以来全国豆粕、玉米价格走势 (元/kg)

注:基础数据来源于华夏养猪网

12 月第 3 周育肥猪配合饲料平均价格为 3.37 元/kg, 同比上涨 4%。

1.5 仔猪价格呈倒“W”走势

2013 年全国仔猪集贸市场均价为 27.33 元/kg, 比 2012 年同期的 29.63 元/kg 下跌 2.30 元; 全年均价最高的月份是 9 月, 达 29.87 元/kg; 全年均价最低的月份是 5 月, 仅 24.89 元/kg (图 7)。



图 7 2010 年以来全国仔猪(10~15kg)价格走势图(元/kg)

2 2014 年猪价整体走势预计

2014 年猪价整体走势总体表现为: 供需趋向平衡, 猪价震荡向上, 整体价格中枢有望比 2013 年抬高。

2013 年 11 月生猪总存栏和能繁母猪存栏量依然维持在较高水平, 说明后期供应仍然充裕, 猪价承压。这些表明 2013 年全国大规模的生猪养殖场和企业较为理性和谨慎, 大量宰杀母猪现

象较少, 只是合理淘汰种猪。由于母猪存栏较高, 加上 2013 年夏天仔猪补栏积极性极高, 后期生长猪总存栏量将继续保持高位。此番的高存栏量可能在 2014 年的 5、6 月份得到均衡缓解。在当前能繁母猪存栏量、社会养猪积极性等多种因素的作用下, 如果不发生大的自然灾害和疫情, 预计 2014 年上半年猪价仍处下跌周期内, 当然并不排除由于节日期间的短暂回调。2013 年底全国生猪出场均价为 14.97 元/kg, 2014 年春节在 1 月底, 估计全国猪价春节前将出现小幅反弹, 有望重上 15.50 元/kg, 但突破 2013 年春节前的 17.4 元/kg 的可能性极小。春节后回落直至二季度末, 三季度起生猪价格有望反弹。预计 2014 年国内生猪价格走势仍形同 2013 年。

根据目前出栏进度和历年变化规律推算, 2014 年春节后的大猪数量会少于 2013 年, 预计猪价下跌的程度可能比 2013 年要低, 2014 年的二季度猪价将会震荡回落探底, 但估计不会出现 2010 年上半年深度下跌局面, 而会出现近似于 2012 年上半年下跌格局, 波动幅度也将小于 2012 年。从各个层面分析, 悲观预测 2014 年生猪全年均价在 14.5 元/kg 以上, 不会低于 2012 年。受刚性需求增速稳中上升影响, 生猪供需将趋向平衡, 2014 年生猪价格中枢有望比 2013 年整体抬高。同时, 全球玉米、大豆产量大幅增加, 在供给端的压力、下游深加工需求疲软的助推下, 玉米、豆粕价格未来保持弱势下跌格局的可能性较高。生猪养殖业未来有望延续“猪价稳步上移, 饲料成本下降”的最佳状态。目前自繁自养生猪的头均盈利近 100 元, 较 4 月底最低点亏损 200 元已大幅改善。2014 年生猪养殖单头盈利有望由 2013 年的 100 元左右恢复到 150~200 元。

启 事

经研究, 2013 年度“永顺杯”优秀论文评选结果将于本刊 2014 年第 2 期公布。敬请留意!

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2014 年 1 月 16 日

冷鲜肉保水性的研究进展

洗理权¹, 董小英², 唐胜球^{2*}, 孔永雄³, 何炳强³

(1. 高要市新桥镇畜牧兽医站, 广东 肇庆 526116; 2. 韶关学院英东农业科学与工程学院, 广东 韶关 512005; 3. 高要市畜牧兽医局, 广东 肇庆 526528)

摘要: 冷鲜肉保水性的高低关系到肉品质量的好坏和商品价值的高低, 研究如何改善冷鲜肉的保水性, 具有重要的科学意义。本文主要就冷鲜肉保水性的重要性以及保水剂的研究与应用作一概述。

关键词: 冷鲜肉; 保水性; 保水剂

中图分类号: S817.27

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0004-03

冷鲜肉(cold meat)亦称冷却肉(chilled meat),是指严格执行检疫制度宰杀后的温热畜肉,迅速经过各种方法使其温度降至0~4℃(此温度高于肉组织的冰点而避免冻结),并在后续的分割加工、流通和零售过程中始终处于不超过7℃的冷却链控制下的生鲜肉^[1],其保质期一般可达7~14天。若采用真空收缩包装,冷鲜肉还能最大程度地保持肉质的鲜嫩和营养,并能将保质期延长到30天以上。由于冷鲜肉始终处于冷链输送低温控制下,大多数微生物的生长繁殖被抑制,肉毒梭菌和金黄色葡萄球菌等病原菌分泌毒素的速度大大降低,可克服热鲜肉、冷冻肉在品质上存在的不足和缺陷。为此,冷鲜肉以其新鲜、肉嫩、味美、营养、卫生的优点受到越来越多消费者的欢迎。早在二十世纪二三十年代,冷鲜肉已在发达国家开始全面推广。在现今消费的生鲜肉中,冷鲜肉约占90%。而肌肉的保水性(Water Holding Capacity, WHC)又称保水力、系水力或持水力(Water Binding Capacity, WBC),是指当肌肉受到外力作用(如加压、切碎、磨绞、加热、冷冻、解冻、贮运或加工等)时,保持原有水分与添加水分的能力,表现为在外力作用下从肌肉蛋白质系统释放出的液体量。肌肉的保水性是冷鲜肉的重要品质指标,并对肉的加工性能及其色泽、嫩度、风味、多汁性、口感等感官指标产生重要影响。可见,研究冷鲜肉的保水性及其保水剂的开发,具有重要的科学意义。

为此,本文就冷鲜肉保水性的重要性与保水剂的研究应用作一概述,为相关产业提供参考。

1 冷鲜肉保水性的重要性

假如保水性欠佳,冷鲜肉将在其加工、贮运、销售和烹制等过程中出现大量的水分蒸发,汁液流失,造成肉制品质量下降,肉的外观、营养价值、滋味和口感也全面降低^[2]。此外,保水性差还会影响冷鲜肉制品外在感观。如果肉表面失水过多,色泽苍白,给人一种不新鲜的感觉^[3],将严重影响消费者对冷鲜肉产品的满意度,且有损企业形象与经济效益,给生产企业带来重大经济损失。目前,发达国家冷鲜肉的滴水损失平均为2.5%左右,而我国冷鲜肉的滴水损失在3.0%~5.0%之间,平均流失率比发达国家高出1.5%以上。随着社会经济与畜牧业的快速发展,我国冷鲜肉占肉产品的比例正在迅速扩大,很快将占到肉类生产总量的30%以上(约2000万吨)。但由于保水性不良,以致每年因由滴水损失造成的肉类重量直接损失要比发达国家高出20多万吨,给冷鲜肉生产企业带来直接经济损失达30亿元人民币。可见,保水性差已成为制约我国冷鲜肉良性发展的重要因素之一。因此,开展冷鲜肉新型保水剂的研究,不仅具有重要的科学理论和学术价值,而且具有重要的社会与经济学意义。

2 冷鲜肉保水性的研究进展

影响冷鲜肉保水性的因素很多,如动物的遗

收稿日期:2013-12-25

*:通讯作者

基金项目:广东省高等院校学科建设专项资金(2009-400);香港铭源基金科研项目(2011-165)

传特性、饲养管理、个体差异、环境应激与生理状况等^[4-6]。研究还发现,冷鲜肉的流失率还与多种保水性相关的基因表达水平有关。在研究与肉质相关的 BVES、SLC3A2、ZDHC5、CS、COQ9 和 EGFR 等基因时发现,BVES、SLC3A2 和 CS 与猪肉保水性密切相关。如能调控上述基因的转录与翻译水平,也可为提高猪肉保水性研究提供理论基础和技术途径^[7]。为此,近年来国内外科技工作者,就如何改善冷鲜肉在生产、贮运、销售过程中持水性下降、产品汁液流失、外观变差和损耗大这一难题,已开展了大量研究,尤其是冷鲜肉保水剂的研究与应用。

2.1 冷鲜猪肉保水剂的研究进展

早在上世纪八十年代,就有人发现木薯变性淀粉具有低糊化温度,可提高果冻水分活度,能应用于肉制品保持水分^[8]。现已证实,木薯变性淀粉与蔗糖酯经混合处理后,可用于冷却猪肉保水性能的改善^[9]。谢华等^[10]研究指出,温度波动是里脊肉出水的重要因素,能够导致里脊肉出水率增加 33%~265%。王兰甜等^[11]研究发现,海藻糖、甘油和山梨醇分别与氯化钠复配,能够一定程度上减少或避免冷冻猪肉的失水现象,使解冻后猪肉还能呈新鲜猪肉的感官品质。新近发现,风速、预冷温度与时间也是影响冷鲜猪肉保水性的主要因素。研究证实,经最佳风速 2.2 m/s、预冷温度 -22 °C 和时间 1.5 h 处理后,可有效提高冷鲜猪肉的保水性^[12]。另有研究证实,如采用不同的冷却步骤也能有效地提高猪肉的保水性,其最佳方案是先将猪肉快速冷却到 10 °C 或 15 °C,并在此温度维持 6 h 后,再快速冷冻到 4 °C。Rosenvold 等^[13]、Zhao 等^[14]报道,外源性钙可阻碍肌肉蛋白的磷酸化,不利于亲水基团的形成,使猪肉的保水性下降。

2.2 冷鲜禽肉保水剂的研究进展

研究报道,浸渍在三聚磷酸钠(TP)或 TP+NaCl 溶液中的完整鸡肉块比浸渍在水中的鸡肉块吸收更多的浸渍液,并且经过热加工后的产品率比没有用 TP 浸渍的要高,嫩度也要好,其机理可能是 TP 或 TP+NaCl 能提高绞碎鸡肉组织水容容量(WHC)和蛋白质的溶解性^[15]。近年来,吴立根等^[16]研究了提高鸡胸肉保水率的工艺方法,发现由改性马铃薯淀粉 0.8%、瓜尔豆胶 0.6%、食盐 0.5%、海藻胶 0.4%与明胶 0.06%组成的配方,在吸水率和

失水率上具有最佳的组合效应。

2.3 冷鲜牛肉保水剂的研究进展

在新鲜牦牛肉中添加不同比例的持水剂(复合磷酸盐)时发现,复合磷酸盐三聚磷酸钠:焦磷酸钠:六偏磷酸钠的比例为 2:2:1,添加量为 0.4%,冷却牦牛肉保水性能和嫩度最佳^[17]。另有研究指出^[18],利用 0.5%的黄原胶溶液浸泡牛肉,可显著提高冷冻牛肉的保水性、pH 值,还能降低牛肉的最大剪切力($P<0.05$),改善其嫩度,但也带来了牛肉色泽的明显劣变。为开发无磷酸盐保水制剂,李雪姣等^[19]研究得出制剂的最佳配比为苹果酸钠 4%、醋酸钠 1.5%、氯化钠 1.5%、水 93%,并发现该制剂具有较好的保水效果及嫩化能力,显著降低牛肉的蒸煮损失率与剪切力。此外,还有研究者报道,酸性物质(食醋、柠檬酸)、碱性物质(碳酸钠、碳酸氢钠)、乳酸链球菌素(Nisin)与蛋白酶等试剂,均能提高冷鲜牛肉的保水性能,降低汁液流失率,还能增加嫩度,杀菌抗氧化,延长保质期等^[20,21]。

2.4 冷鲜鱼肉保水剂的研究进展

冯慧等^[22]研究发现,冷冻鱼肉中添加多聚磷酸盐可延缓活性巯基的氧化或二硫键的形成,以增强蛋白质的抗冻性,从而长时间地保持蛋白质结合水的能力,相应地提高了鱼肉的持水力。另有研究证实,磷酸酯淀粉对冷冻大菱鲆鱼肉有明显的保水效果和很好的冻融稳定性,其保水效果和冻融稳定性均随着取代度的增加即制备磷酸酯淀粉的反应时间增加和反应温度的提高而增强^[23]。

综上所述,关于冷鲜肉保水性的研究已取得了大量进展,但大多停留在某一层面或环节,目前尚无提高冷鲜肉保水性工艺与管理规范的技术集成体系,很难发挥关键技术协同作用的组合优势。随着人们生活水平的提高与保健意识的增强,对冷鲜肉品质和企业经济效益提出了更高的要求。为此,如何将先进的冷鲜肉保水技术与工艺进一步深入转化和加速产业化,显得越来越紧迫和重要,也是未来冷鲜肉保水性研究的重要趋势。

参考文献:

- [1] 孙京新,汤晓艳,周光宏,等.宰后冷却工艺对冷却猪肉肉质、质量分类的影响[J].农业工程学报,2006(8):203-208.
- [2] 夏文水.肉制品加工原理与技术[M].北京:化学工业出版社,

2003:50-58.

[3] 蔡淑伟. 冷却猪肉保水性的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2004.

[4] Huff-Lonergan E, Lonergan S M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes[J]. Meat Sci, 2005, 71(1):194-204.

[5] 柳艳霞, 高晓平, 赵改名, 等. 宰后因素对肌肉保水性的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16):4846-4848.

[6] Luca A D, Elia G, Hamill R, et al. 2-D DIGE proteomic analysis of early post mortem muscle exudate highlights the importance of the stress response for improved water-holding capacity of fresh pork meat[J]. Proteomics, 2013.

[7] Brunner R M, Srikanthai T, Murani E, et al. Genes with expression levels correlating to drip loss prove association of their polymorphism with water holding capacity of pork[J]. Mol Biol Rep. 2012;39(1):97-107.

[8] 赵春涛. 变性淀粉在食品中应用的初步研究[J]. 食品工业, 1989(4):4-6.

[9] 赵改名, 孙灵霞, 柳艳霞, 等. 木薯变性淀粉和蔗糖酯对冷却肉保水效果的影响[J]. 食品科学, 2009, 16:286-289.

[10] 谢华, 张志伟, 尤文辉, 等. 里脊肉汁液流失控制技术研究[J]. 肉类工业, 2005(4):38-39.

[11] 王兰甜, 常忠义, 杜磊, 等. 不同保水剂对冷冻猪肉的保水效果[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2008, 36(4):213-217.

[12] Chen H, Dong X, Yao Z, et al. Effects of prechilling parameters on water-holding capacity of chilled pork and optimization of prechilling parameters using response surface methodology[J]. J Anim Sci, 2012, 90(8):2836-2841.

[13] Rosenvold K, Borup U, Therkildsen M. Stepwise chilling: tender pork without compromising water-holding capacity[J]. J Anim Sci, 2010, 88(5):1830-1841.

[14] Zhao J, Xiong Y L. Nitrite-cured color and phosphate-mediated water binding of pork muscle proteins as affected by calcium in the curing solution[J]. J Food Sci, 2012, 77(7):C811-817.

[15] Young L L, Lyon B G, 刘成国. 有无氯化钙和氯化钠时, 三聚磷酸钠对鸡胸肉保水性和剪切阻力的影响[J]. 肉类工业, 1987(6):38-40.

[16] 吴立根, 王岸娜, 吴晓燕, 等. 提高鸡胸肉保水率的研究[J]. 食品研究与开发, 2006(8):114-117.

[17] 曹效海. 影响牦牛肉保水性能的因素及其嫩度的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(9):1-3.

[18] 方红美, 王武, 陈从贵. 黄原胶对牛肉品质影响的研究[J]. 食品科学, 2008(11):106-109.

[19] 李雪姣, 马悦培, 谌徽, 等. 无磷酸盐制剂对牛肉嫩度和保水性的影响[J]. 食品工业科技, 2010(3):109-111.

[20] 杨铭铎, 霍力, 倪晨, 等. 应用嫩化剂提高牛肉嫩度的研究[J]. 黑龙江商学院学报(自然科学版), 1991(6):47-51.

[21] 黄蕾, 雷晓勇. 鲜牛肉综合保鲜技术的研究[J]. 肉类工业, 2002(2):31-34.

[22] 冯慧, 薛长湖, 高瑞昌, 等. 多聚磷酸盐在冷冻罗非鱼肉中的降解及其对鱼肉品质的影响[J]. 食品工业科技, 2008(9):239-241.

[23] 赵前程, 谢智芬, 刘俊荣, 等. 磷酸酯淀粉对冷冻大菱鲆鱼肉保水效果的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2008(6):65-68.



·行业信息·

我国猪饲料抽检合格率 99.7% 历来最高

1月15日农业部召开新闻发布会,介绍农产品质量安全监管有关情况。农业部副部长陈晓华表示,我国国家对“瘦肉精”实施“零容忍”政策,呼吁国际社会效仿。

陈晓华表示,相较于有的国家对“瘦肉精”允许少量饲喂或规定使用的范围和期限,中国对“瘦肉精”采取的是“零容忍”的政策,对于“瘦肉精”中国也在积极地呼吁国际社会,要坚决取消这种添加物的使用。

据陈晓华介绍,针对“瘦肉精”农业部连续几年采取了9个部门联合行动专项整治措施。从最近几年抽检的情况看,去年全年,“瘦肉精”的抽检合格率达到99.7%,是农业部对“瘦肉精”非法添加物监测以来水平最高的,这也反映了整治的成果。

陈晓华还表示,对于“瘦肉精”的整治工作重点一个是要防止死灰复燃,第二是也要防止一些新的物质出现,“瘦肉精”的种类很多,要防范新的“瘦肉精”衍生品的出现。所以要不断地扩大监测范围和频率,以保证产品安全。(信息来源:中国网)

脂肪酶对蛋鸡生产性能的影响试验

赵必迁¹, 李学海²

(1. 雅安市农业局, 四川 雅安 625000; 2. 攀枝花市行远牧业有限公司, 四川 攀枝花 617061)

摘要: 本试验旨在研究脂肪酶对蛋鸡生产性能的影响。试验采用单因子随机分组试验设计, 选取9 600只370日龄的罗曼蛋鸡, 随机分到2个处理组, 每个处理组8个重复, 每个重复600只鸡。基础饲料采用玉米-豆粕型饲料。试验组在对照组代谢能水平2.65 Mcal/kg基础上, 减少油脂添加量而降低30 kcal/kg代谢能, 同时添加200 mg/kg脂肪酶(其酶活5 000 U/g)。试验结果表明蛋鸡产蛋中后期(370日龄), 在饲料代谢能水平降低30 kcal/kg的同时添加脂肪酶, 可显著提高平均产蛋率($P < 0.05$), 极显著地降低平均死亡率($P < 0.01$)。

关键词: 脂肪酶; 蛋鸡; 生产性能

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0007-03

Effects of Feed Lipase on the Production Performance of Laying Hens

Zhao biqian¹, Li xuehai²

(1. Agriculture Bureau of Ya'an, Ya'an 625000, China; 2. Xingyuan Animal Husbandry Limited Company of Panzhihua city, Panzhihua 617061, China)

Abstract: The objective of the present study was to investigate the effects of lipase on the production performance of laying hens. A single factorial randomized experimental design was adopted. 9600 370-day old Roman pink shell layers were randomly assigned to 2 treatment groups based on body weight with 8 replicate of 600 laying hens. The basal diet was the corn-soybean meal. Metabolic energy level of the control group was 2.65Mcal/kg. The experimental group was decreased 30kcal/kg metabolism by reducing the oil content and add the 200mg/kg lipase (enzyme activity of 5 000 U/kg). The results showed that adding 1000U/kg lipase meanwhile decreasing 30kcal/kg metabolism of dietary energy level on the basis of ME2.65Mcal/kg of laying hens (370 days old) could significantly improve the average egg production rates ($P < 0.05$), and significantly decrease the average mortality rates ($P < 0.01$).

Key words: Lipase; laying hens; production performance

脂肪酶在脂质代谢中发挥重要作用, 是脂肪消化利用最基本的酶, 能将脂肪水解为游离脂肪酸、甘油和甘油单酯供动物吸收利用^[1]。实际生产中蛋鸡采用高能设计, 需额外添加油脂, 但由于蛋鸡产蛋期长, 机体分泌的脂肪酶可能存在不足, 饲料总体的脂肪消化利用率可能较低, 影响蛋鸡的生产性能^[2]。肉鸡等畜禽试验表明: 添加脂肪酶可在一定程度上降低饲料能量水平, 降低油脂添加量, 对生产性能没有不良影响, 而且改善效益^[3-5]。蛋鸡上使用脂肪酶效果国内报道较少。本试验在

蛋鸡产蛋中后期添加脂肪酶降低饲料能量水平, 考察其对产蛋性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脂肪酶: 脂肪酶由四川禾本生物工程有限公司提供, 颗粒状, 酶活保证值5 000 U/g。试验动物: 370日龄罗曼粉壳蛋产蛋鸡, 由攀枝花市行远牧业有限公司提供。

1.2 试验设计

试验选取370日龄健康、生产性能相近的罗

曼蛋鸡 9 600 只,随机分为 2 个组,即对照组和试验组;每组 8 个重复,每个重复 600 只鸡。对照组为正常能量水平(代谢能 2.65 Mcal),试验组在对照组基础上降低 30 kcal/kg(减少油脂添加量)的能量,同时添加 200 mg/kg 脂肪酶。

1.3 基础饲料

饲料配制参照 NRC(1994)中的蛋鸡饲养标准和中国 NY/T33-2004 中的蛋鸡饲养标准,结合生产实际情况,采用玉米-豆粕型饲料,粉料。对照组饲料和试验组饲料组成及营养水平见表 1。

1.4 饲养管理

试验于 2013 年 8 月 20 日到 2013 年 10 月 20 日在攀枝花市行远牧业公司蛋鸡场进行。预试期 1 w,试验期 6 w,每笼饲喂 6 只鸡。自由采食和饮水。鸡舍温湿度自动控制,温度稳定在 21~23 °C,湿度稳定在 55%~65%。按常规饲养管理、消毒防疫以及免疫接种。

1.5 指标的测定

试验期间每天记录产蛋率、破蛋率、蛋重、采食量以及死亡数。试验结束累计计算各处理组的平均产蛋率、平均破蛋率、平均蛋重、平均日采食量、平均料蛋比、平均周死亡率。

1.6 数据统计处理

试验数据用 Excel2003 进行数据整理,采用 SPSS13.0 的 One-way ANOVA 进行方差分析,结合 Duncan 法进行多重比较。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。数据以平均数±标准差表示。

2 试验结果

脂肪酶试验组与对照组相比,平均产蛋率显著提高 3% ($P<0.05$); 平均周死亡率极显著降低 39.4% ($P<0.01$); 平均料蛋比降低 2.7%, 平均破蛋率、平均蛋重和平均日采食量,脂肪酶试验组与对照组间差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

本试验结果表明在基础饲料能量水平 ME 2.65 Mcal/kg 基础上降低 30 kcal/kg 的能量并添加 200 mg/kg 脂肪酶及 5 000 U/kg 的脂肪酶,可显著提高平均产蛋率 ($P<0.05$),极显著降低平均死亡率 ($P<0.01$),有降低平均料重比的趋势,可能是添加外源的脂肪酶提高了饲料中脂肪的消化利用,改善能量的利用率,从而改善了产蛋性

表 1 对照组饲料和试验组饲料组成及营养水平

饲料原料(%)	对照组(%)	试验组(%)
玉米	58.500	59.280
麦麸	2.000	2.000
豆粕(CP≥43%)	23.200	23.100
菜粕(CP≥35%)	4.000	4.000
油脂	1.300	0.600
蛋氨酸	0.130	0.130
钙粒	7.700	7.700
钙粉	1.300	1.300
磷酸氢钙	1.100	1.100
食盐	0.270	0.270
小苏打	0.100	0.100
脂肪酶	0.000	0.020
植酸酶	0.014	0.014
包被维 C(≥97%)	0.020	0.020
微量矿物元素预混剂 ¹⁾	0.200	0.200
多维预混剂 ²⁾	0.040	0.040
黄色素(胡萝卜阿卜酯≥10%)	0.004	0.004
红色素(斑蝥黄≥10%)	0.002	0.002
氯化胆碱(50%)	0.120	0.120
合计	100.000	100.000
营养水平	营养指标(%)	
粗蛋白	16.5	16.5
代谢能(MCal)	2.65	2.62
总赖氨酸	0.82	0.82
总蛋氨酸	0.38	0.38
总含硫氨基酸	0.66	0.66
苏氨酸	0.63	0.63
色氨酸	0.19	0.19
钙	3.6	3.6
总磷	0.54	0.54
有效磷	0.32	0.32

1): 微量矿物元素预混剂提供的微量矿物元素折算到每千克饲料中,为:铁 80mg、铜 10mg、锰 100mg、锌 100mg、硒 0.3mg、碘 0.6mg。2): 多维预混剂提供的多种维生素折算到每千克饲料中,为:维生素 A 12000IU、维生素 D 3200IU、维生素 E 20IU、维生素 K₃ 2.4mg、维生素 B₁ 1.2mg、维生素 B₂ 4.8mg、维生素 B₆ 3.2mg、维生素 B₁₂ 20 μg、叶酸 800 μg、烟酸 32mg、泛酸钙 10mg。

能,降低油脂的添加,降低蛋鸡消化道的负担,减少肠道疾病发生从而降低死亡率。在肉鸡和母猪上添加脂肪酶也有积极的提高作用。李芳林等^[3]在玉米-豆粕型日粮中添加微生物脂肪酶可显著

表 2 脂肪酶对产蛋鸡生产性能的影响

处理组	平均产蛋率(%)	平均破蛋率(%)	平均蛋重(g)	平均日采食量(g)	平均料蛋比	平均周死亡率(%)
对照组	82.1±1.6 ^{a1)}	2.46±0.09	62.3±1.2	113.9±1.5	2.22±0.05	0.38±0.06 ^a
试验组	84.6±1.4 ^b	2.39±0.12	62.1±1.1	113.7±1.2	2.16±0.06	0.23±0.04 ^b

1): 数据右上角不同小写字母表示差异显著; 数据右上角不同大写字母表示差异极显著。

提高提高肉鸡的日增重 ($P<0.05$), 降低料肉比 ($P<0.05$), 提高表观代谢能 ($P<0.05$)。马卿山等^[4]在肉鸡低能饲料中添加 200 mg/kg 脂肪酶(酶活 5 000 U/g) 能够显著改善肉鸡后期及全期料重比, 改善肉鸡体重和日增重, 代谢试验表明脂肪酶显著提高了脂肪表观利用率 ($P<0.05$), 对于物质表观利用率有提高的趋势。刘桂武等^[5]在哺乳母猪及断奶仔猪饲料中分别添加 0.02%、0.03% 的微生物脂肪酶(活性为 20 000 U/g), 结果也发现脂肪酶能显著提高哺乳母猪及断奶仔猪的总能消化率、脂肪消化率, 并且 0.03% 脂肪酶组显著提高了断奶仔猪的干物质消化率。而 Lichovnikova 等^[6]在 21-72 周龄褐壳蛋鸡小麦型饲料(粗蛋白质含量为 17.53%, 代谢能为 2.77 Mcal/kg, 未添加外源油脂)中添加 300 U/kg 饲料的脂肪酶, 结果发现其对 21~72 周龄褐壳蛋鸡的产蛋率、蛋重、采食量、料蛋比影响均不显著。这可能是由于添加的脂肪酶剂量和酶活较低、饲料脂肪含量较低以及饲料设计能量较高等原因, 使得添加外源脂肪酶效果不显著。

4 结论

在蛋鸡产蛋中后期(370 日龄)饲料代谢能水平 ME 2.65 Mcal/kg 基础上, 降低 30 kcal/kg 的代谢能, 添加 200 mg/kg 脂肪酶, 可显著提高平均产蛋率 ($P<0.05$), 极显著地降低平均死亡率 ($P<0.01$)。

参考文献:

- [1] 王海燕, 李富伟, 高秀华. 脂肪酶的研究进展及其在饲料中的应用[J]. 饲料工业, 2007, 28(6): 14-17.
- [2] 郭小权, 胡国良, 曹华斌, 等. 高能量低蛋白质日粮对蛋鸡载脂蛋白 A I 和脂质代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 187-193.
- [3] 李芳林, 石宝明, 单安山, 等. 脂肪酶对肉鸡生长性能、表观代谢能、血液生化指标及腹脂率的影响[J]. 饲料博览, 2012(2): 1-6.
- [4] 马卿山, 丁雪梅, 白世平, 等. 饲料添加脂肪酶对肉鸡生长性能及养分利用率的影响[J]. 动物营养学报, 2013, 25(10): 2447-2458.
- [5] 刘桂武. 脂肪酶、脂肪粉在母猪及断奶仔猪日粮中的应用研究[D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2012.
- [6] Lichovnikova M, Zeman L, Klecker D, et al. The effects of the long-term feeding of dietary lipase on the performance of laying hens [J]. Czech Journal of Animal Science, 2002, 47(4): 141-145.

· 行业信息 ·

《广东省兽药管理规章制度汇编》受欢迎和好评

按照党的群众路线教育实践活动建章立制要求, 为便于各级农牧管理部门提高办事效率和服务水平, 便于兽药生产、经营、使用单位熟悉有关规定, 近日, 省农业厅、省畜牧兽医局编印了《广东省兽药管理规章制度汇编》, 免费提供给全省各级农牧管理部门和兽药生产企业, 受到广泛欢迎和好评。较早之前编印的《国家有关禁用药物、兽药、物质 兽药停药期, 兽药最高残留限量规定》小册子, 被作为全国兽药会议的重要会议材料, 电子版供各省市免费下载。

2013 年, 省农业厅、省畜牧兽医局深入开展党的群众路线教育活动, 践行群众路线, 多次组织召开兽药生产、经营、使用企业座谈会, 面对面听取意见, 并组织问卷调查, 深入企业和基层调研, 广泛听取兽药监管的意见和建议, 各项工作尽最大限度便民利民。建章立制, 新制订出台黑名单管理制度和对管理部门与工作人员告知书, 并对原有的部分规章制度进行了修订。兽药管理工作群众满意度高, 省委省政府和农业部充分肯定, 兽医处被评为全国农业先进集体, 推荐为省直机关文明单位。(信息来源: 广东农业信息网)

季节对育成母牛产粪量及粪污染物排放量的影响

张振伟¹, 庞伟英², 周玉香³, 张巧娥³, 闫宏^{3*}

(1. 宁夏中卫山羊选育场, 宁夏 中卫 755006; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 3. 宁夏贺兰县农牧渔局, 宁夏 银川 752000)

摘要: 选择健康状况良好、体重相似、出生日期相近的中国荷斯坦育成母牛5只作为试验对象, 采用全收粪法研究育成母牛在一年四季中产粪量及粪污染物(N、P、Cu、Zn和有机质)排放量的变化情况及其规律。结果表明: 不同季节间育成母牛产粪量与粪样中机质及N、P、Cu、Zn污染物的排放量均存在着极显著($P < 0.01$)或显著($P < 0.05$)的差别, 因此, 根据不同季节产粪量及粪中污染物排泄规律来研究配置符合育成母牛的均衡饲料配方, 可达到既满足育成母牛的生产需要, 又能最大限度地降低污染物排放量, 减少奶牛场污染的目的。

关键词: 季节; 育成母牛; 产粪量; 污染物; 排放量

中图分类号: S823.8⁹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0010-03

The Effects of Season Chang on Faecal Output and Pollutant Excretion in Growing Cow

Zhang Zhenwei¹, Pang Weiying², Zhou Yuxiang³, Zhang Qiaoe³, Yan Hong^{3*}

(1. Ningxia Zhongwei Goat Breeding Field Ningxia Zhongwei 755006, China; 2. Agricultural and Livestock Bureau of Helan County Ningxia Ningxia Yinchuan 752000, China; 3. Ningxia University Ningxia Yinchuan 750021, China)

Abstract: 5 chinese holstein Growing cows with good health, similar weight, and similar date of birth were choose as test objects. The faecal output and pollutant emissions(N, P, Cu, Zn and Organic matter) of the Growing cows were screened in one year round. The results showed that, season changing had extremely significant ($P < 0.01$) or significant ($P < 0.05$) effects on the faecal output and Organic matter, N, P, Cu, Zn pollutant emissions of the Growing cows. So according to the pattern of faecal output and pollutant discharge in faecal on different seasons, re-arrange the feed formula was not only to meet the production needs of growing cows, but also minimize the discharge of pollutants and reduce the pollution of the dairy farm.

Key words: Season; Growing cows; Faecal Output; Pollutant; Emission

经济的高速发展与农业结构的不断调整, 促进了畜牧业生产规模的不断扩大和集约程度的不断提高, 但由于规划、管理和技术滞后等原因, 导致有相当一部分养殖废弃物未能得到充分地利用, 而是作为污染物被排放到环境中^[1-3]。据对银川周边的一个存栏量800头左右的奶牛养殖场进行调查得出, 每年奶牛场粪产生量0.38万t, 尿产生量0.27万t, 如不及时对这些废弃物进行处理, 其内所含的污染物势必对环境造成巨大的危

害。因此, 本文对育成母牛在不同季节的产粪量及粪中污染物的成分与含量进行了测定与分析, 旨在寻找季节与污染物成分、含量间的规律性, 以便为控制与治理奶牛场污染提供科学的理论依据与数据基础。

1 材料与方 法

1.1 试验地点与时间

试验地点在宁夏银川某奶牛养殖场内。试验时间从2007年10月至2008年8月, 分春、夏、

秋、冬 4 个季节进行;每个季节连续采样 5 d,保证 3 d 数据有效^[4]。

1.2 试验动物的选择

选择健康状况良好、体重相似、出生日期相近的中国荷斯坦育成母牛 5 头作为试验对象。

1.3 试验动物的饲养管理

试验牛采用栓系式舍饲饲养,饲料饲喂、防疫与奶牛场其他育成母牛同步进行。试验牛每日饲喂 3 次,自由饮水。试验期间记录每天每头试验牛的粪排放量。

1.4 样品的采集与处理

试验开始后,收集每天每头试验牛的全部粪样,称量,记录,并算出每天每头试验牛的产粪量。将粪样充分混匀后,采集粪样约 500 g,分为 2 份:其中 1 份粪样约 300 g,移至自封袋中,不进行任何处理,置于 -20 °C 冷冻保存,用于粪中含水率、铜、锌、总磷、有机质的测定;另 1 份粪样约 200 g 放入自封袋中后,按 100 g 粪样加 1mL 10% H₂SO₄ 进行固氮,-20 °C 冻存,用于粪总氮的测定。

1.5 测定指标与方法

实验室粪样分析测定指标包括含水率、总氮(TN)、总磷(TP)、铜(Cu)、锌(Zn)、有机质。具体测定方法如下:

含水率的测定——采用烘干法测定;

TN 的测定——采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定;

TP 的测定——采用 HClO₄-H₂SO₄ 消煮钼锑抗比色法测定;

Cu、Zn 的测定——采用 HF-HNO₃-HClO₄-H₂SO₄ 消煮-原子吸收法测定;

有机质的测定——采用重铬酸钾容量测定。

1.6 数据统计与分析

所得数据采用 Excel2000 和 SPSS17.0 软件包进行数据统计与方差分析,测定结果以平均数(\bar{X})±标准差(S)表示^[5]。

2 结果与分析

2.1 季节对育成母牛产粪量与粪污染物含量的影响

季节对育成母牛产粪量及粪中 N、P、Cu、Zn 与有机质等排放量的影响分析详见表 1。

由表 1 可以看出,不同季节间育成母牛产粪量与粪样中有机质及 N、P、Cu、Zn 污染物的排放量均存在着极显著($P < 0.01$)或显著($P < 0.05$)的差别。

粪样中有机质含量以夏季最低,为 48.83%,以冬季最高,为 55.00%,差异极显著($P < 0.01$)。

N 排泄量以夏季最高,高达 0.36%,极显著地高于秋、冬季($P < 0.01$),高于春季($P > 0.05$);与春、秋和冬季相比,夏季 N 排泄量依次提高 5.88%、16.13%和 20.00%;与秋、冬季相比,春季 N 排泄量分别提高 9.68%($P > 0.05$)和 13.33%($P < 0.05$)。

P 排泄量以夏季最高,为 1.68%,极显著地高于其他各季节($P < 0.01$),依次高出 136.62%、118.18%和 133.33%。

Cu 排泄量以春季最高,为 43.02 μg/g,极显著地高于秋季($P < 0.01$),显著地高于夏季($P < 0.05$),高于冬季($P > 0.05$);依次提高 80.98%、12.06%和 1.49%。

Zn 排泄量以春季最高,为 147.63 μg/g,以夏季最低,为 117.75 μg/g,差异极显著($P < 0.01$);与

表 1 不同季节对育成母牛产粪量及粪污染物含量的影响分析

项 目	春季	夏季	秋季	冬季	平均值
含水率(%)	80.41±0.45	80.83±0.92	81.44±1.45	81.47±0.36	81.04
N(%)	0.34±0.025 ^{ad}	0.36±0.015 ^a	0.31±0.020 ^b	0.30±0.010 ^{bc}	0.33
P(%)	0.71±0.029 ^a	1.68±0.063 ^b	0.77±0.083 ^a	0.72±0.028 ^a	0.97
Cu(μg/g)	43.02±3.91 ^{ab}	38.39±1.32 ^{ab}	23.77±2.32 ^b	42.39±0.91 ^a	36.89
Zn(μg/g)	147.63±8.39 ^{ab}	117.75±8.50 ^b	125.47±13.55 ^b	144.43±2.90 ^{ab}	133.82
有机质(%)	52.61±2.98	48.83±1.84 ^a	50.34±2.74 ^a	55.00±0.41 ^{bc}	51.70
产粪量(kg)	12.91±1.04 ^a	14.75±0.96 ^a	12.77±1.95 ^a	6.40±0.98 ^b	11.71

1): 同行数据肩上标有不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),标有相同字母或不标字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

夏、秋和冬季比较,春季 Zn 排泄量分别提高 25.38% ($P<0.01$)、17.66% ($P<0.01$)和 2.22% ($P<0.01$)。

产粪量以冬季最低,为 6.40 kg,极显著地低于其他各季节 ($P<0.01$);依次降低 107.72%、130.47%和 99.53%。

3 小结与讨论

3.1 不同季节间育成母牛产粪量与粪样中有机质及 N、P、Cu、Zn 污染物的排放量均存在着极显著 ($P<0.01$)或显著 ($P<0.05$)的差别。据尤克强等报道,每头育成母牛每天产粪量在 18~20.5 kg 之间^[6,7]。王会群发现^[8],育成母牛粪样全磷含量在 0.24%~0.44%之间。史鹏飞报道^[9],育成母牛产粪量及 N、P、Cu、Zn 污染物排泄量随季节变化有明显地不同,这与本研究所得结果相似;其粪样含水率在 77.35%~78.90%之间(年含水率为 78.00%),N 排放量在 1.83%~2.07%之间(N 年排放量为 1.99%),P 排放量在 1.10%~2.03%之间(P 年排放量为 1.68%),Cu 排放量在 35.02~47.56 $\mu\text{g/g}$ 之间(Cu 年排放量为 40.35 $\mu\text{g/g}$),Zn 排放量在 218.77~345.18 $\mu\text{g/g}$ 之间(Zn 年排放量为 259.86 $\mu\text{g/g}$),有机质含量在 53.31%~55.53%(年有机质含量为 54.31%);除粪样含水率外,其他粪样指标排泄量均高于本研究所测得结果。造成这种现象的原因可能与试验动物品种及饲料营养水平的不同有关。

3.2 产粪量与粪样中 N、P 含量以夏季最高,随季节的变化呈现出先升高后降低的趋势;Cu、Zn 含量以春季最高,随季节的变化呈现出降低趋势;粪样含水率与有机质排放量均冬季最高。因此,可根据不同季节产粪量及粪中污染物排泄规律来研究配置符合成乳母牛的均衡饲料配方,从而达到既满足成乳母牛的生产需要,又能最大限度地降低污染物排放量,减少奶牛场污染的目的。

参考文献:

- [1] 王诚,张印,蔺海朝,等.猪粪尿中 N、P、Cu、Zn 排放量的测定与分析[J].家畜生态学报,2011,32(4):81-84.
- [2] 李纪周.天津市规模化畜禽养殖场粪污治理及资源化利用调查研究[D].中国农业科学院,2011.
- [3] 庞凤梅,李鹏,李玉浸,等.天津市畜禽粪便年排放量估算及控制对策研究[J].农业与发展,2008,(3):82-86.
- [4] 李艳,朱继红,张振伟,等.不同生长阶段牛排粪量与尿液 pH 值昼夜变化的研究[J].畜牧与兽医,2009,41(10):43-44.
- [5] 明道绪,王钦德,耿社民,等.生物统计附试验设计[M].第3版.北京:中国农业出版社,2001.
- [6] 王新谋.家畜粪便学[M].上海交大出版社,1998:266.
- [7] 尤克强,高玉平.奶牛场粪污生产生物有机肥的工艺技术[J].中国乳业,2007,4:57-58.
- [8] 王会群.奶牛集约化生产体系中磷素平衡及其环境效应[D].河南农业大学 2010.
- [9] 史鹏飞.规模化奶牛场产污系数和排污系数测定研究[D].河南农业大学,2009.



·行业信息·

农业部:2013 年“瘦肉精”问题总体可控

据农业部监测,2013 年畜产品“瘦肉精”抽检合格率为 99.7%,目前“瘦肉精”问题总体可控、稳定向好。

农业部有关负责人指出,高法、高检公布《关于办理危害食品安全刑事案件适用法律若干问题的解释》后,农业部及时举办培训班,截至 2013 年 10 月底,各级畜牧兽医部门共组织与“瘦肉精”有关的培训 1.2 万场次,通过媒体宣传 4.67 万次,发放宣传材料 669 万份。

在养殖相对分散、追溯体系尚未全面建成的现实条件下,抽检是质量安全监管不可或缺的手段。2013 年,农业部在生猪养殖大省开展“瘦肉精”交叉拉网检测,对肉牛肉羊大省实施突击抽检,对公布禁用的“瘦肉精”类物质进行全面排查。各级畜牧兽医部门争取经费近 5 亿元,抽检各类样品 941.4 万批次。以屠宰环节为重点、各环节统筹兼顾的抽检制度基本形成。福建、浙江等省对定点屠宰场形成了“县级天天抽检,市级月月抽检,省级季度抽检”的工作制度。

经过连续 3 年持续推动,目前省与省之间、部门之间协调配合渠道畅通,跨省案件通报协查、涉嫌犯罪移送等工作机制有效运转。据不完全统计,2013 年各级畜牧兽医部门在“瘦肉精”专项整治中共立案查处违法案件 309 起,向公安机关移送 63 起。(信息来源:光明日报)

中草药制剂苦木汤对仔猪生产性能的影响试验

李国柱, 陈 灏, 林广基

(东莞市黄江镇农业技术服务中心, 广东 东莞 523000)

摘 要: 试验选用相同日龄、体重相近(20 kg), 健康状况良好的三元杂交商品仔猪(杜×大×长)96头, 随机分为3个处理组, 每组4个重复组, 每个重复组8头猪, 公母各半。依据NRC(1998)猪的营养需要设计玉米-豆粕型基础日粮。在基础日粮中添加抗生素为对照组日粮, 在基础日粮中添加苦木汤300 g/t和抗生素构成试验I组日粮, 在基础日粮中添加苦木汤400 g/t构成试验II组日粮。试验期为20 d。结果表明: 在日增重方面, 试验组日增重均显著高于对照组($P < 0.05$), 提高幅度分别为8.27%、9.06%; 试验组的仔猪的料重比、腹泻率均显著低于对照组($P < 0.05$); 试验I组和试验II组间日增重、料肉比、腹泻率无显著差异($P > 0.05$)。表明苦木汤可改善动物的消化性能, 提高动物免疫抗病能力及预防仔猪腹泻。

关键词: 苦木汤; 断奶仔猪; 生产性能

中图分类号: S853.75

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0013-03

饲料中添加抗生素可以预防仔猪腹泻、促进成长, 但又会出现抗生素的耐药性和药物残留等问题^[1]。如何平衡养猪户追求的高效养殖和消费者追求的品质可靠已成为了大众关注的焦点。以中草药取代饲料添加剂取代抗生素添加剂已成为趋势。

苦木有以下特点^[2]: (1)资源丰富, 分布广泛; (2)多功能性。苦木含有苦味质、苦木素、苦木碱、甲基苦木碱、鞣质等, 具有广谱抗菌和消炎止痛功效; (3)天然性, 苦木本身就是地球和生物机体的组成部分, 保持了各种成分结构的自然状态和生物活性, 同时又经过长期的实践检验对动物有益无害, 并且在应用之前经过科学炮制去除有害部分, 保持纯净的天然性。(4)安全可靠, 苦木的副毒作用小, 无耐药性, 不易在畜产品中产生有害残留。“苦木汤”, 是以苦木为材料熬制的, 本文通过研究在饲料中添加苦木汤和抗生素对仔猪生产性能的影响, 探讨苦木汤是否可以成为新一代饲料添加剂应用于生产。

1 材料与方法

1.1 试验的时间与地点

试验于2012年7月8日至2012年7月28日, 在广东省惠东某猪场完成。

1.2 试验动物的选择及分组

选择来源相同、体重相近(20 kg), 健康状况良好的三元杂交商品猪(杜×大×长)96头, 随机分为3个处理, 每个处理设4个重复, 每个重复8头猪。

1.3 试验设计及试验日粮

依据NRC(1998)猪的营养需要设计玉米-豆粕型基础日粮(见表1)。在基础日粮中添加抗生素构成对照组日粮; 在基础日粮中添加300 g/t苦木汤和抗生素构成试验I组日粮; 在基础日粮中添加400 g/t苦木汤构成试验II组日粮。饲养期20 d, 试验设计见表2。本试验所用的苦木汤由广州康氏生物科技有限公司提供, 批号:2012008。本试验所用抗生素选用硫酸抗敌素, 由西安山连生物科技有限公司提供, 批号:201203016, 每吨饲料添加硫酸抗敌素20 g(有效成分)。

1.4 日常管理

半开放式猪舍, 网上平养, 干粉状饲料, 自由采食和饮水; 常规程序免疫消毒。试验期舍内周平均温度分别为28.6℃、29.3℃、29.0℃、27.2℃。

1.5 生产性能指标测定及方法

生产性能测定, 是指在试验开始与结束时以重复为单位对仔猪进行称重, 试验过程中以重复为单位记录仔猪的采食量, 计算平均日增重、平均日采食量和料肉比。

表 1 试验用基础日粮

原料名称	对照组	试验组 I	试验组 II	营养指标	营养浓度
玉米(kg)	660	660	660	粗蛋白	17.56
豆粕(kg)	250	250	250	钙	0.70
麸皮(kg)	50	50	50	总磷	0.53
苦木汤(g)	0	300	400	猪消化能	3277.05
4%预混料(kg)	40	40	40	赖氨酸	0.93
合计(kg)	1000	1000	1000	蛋+胱氨酸	0.63

表 2 试验设计

处理	添加剂
对照组	基础日粮+抗生素(硫酸抗敌素)
试验组 I	基础日粮+300 g/t 苦木汤+抗生素(硫酸抗敌素)
试验组 II	基础日粮+400g/t 苦木汤

1.5.1 采食量 以重复组为单位,准确记录每次的投料量。阶段结束的当天下午最后一次投料后,采用清袋、清槽法计量剩余饲料重量,确定各重复组饲料消耗,从而计算其采食量。

1.5.2 日增重 于试验开始当天晨、结束的第二天晨,以重复组为单位,空腹称重。由所得初重、末重计算总增重,进而计算出日增重。

1.5.3 料肉比 由采食量、日增重,计算各重复组的料肉比。

1.5.4 腹泻率 试验期间每天定时观察并记录各组仔猪腹泻情况,按下式计算腹泻率:

腹泻率(%)=[腹泻头数总和/(猪头数×试验天数)]×100%

1.5.5 死淘率 试验期内以重复组为单位,准确记录其死淘猪只数,然后计算各自死淘率。

1.6 数据的处理

对以上所得数据以 SPSS10.0 统计软件作方差分析,并根据差异的显著性做多重比较。

2 结果与分析

结果见表 3。由表 3 可以看出,与对照组相比,在成活率相同的情况下,试验组 I 和试验组 II 的日增重显著高于对照组 ($P < 0.05$)。试验组 I 的料肉比、腹泻率显著低于对照组 ($P < 0.05$)。试验组 II 料肉比和腹泻率较对照组有所降低的趋势 ($P > 0.05$)。试验组比对照组采食量高,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 苦木汤对仔猪生长性能的影响

苦木具有清热解毒;燥湿杀虫。用于风热感冒,咽喉肿痛,腹泻下痢,湿疹,可以抗菌消炎,抑制仔猪腹泻,增加食糜在肠道内的消化时间,提高食糜的有效吸收,从而促进动物的生长。广西兽医研究所兽药开发中心提取苦木的生物碱有效成分,用于预防和治疗鸡的大肠杆菌病,取得了良好的疗效。

在断奶仔猪的饲料中,不论是苦木汤部分取代抗生素还是完全取代抗生素,料肉比均较为明显的下降,在日增重也显著提高。提示苦木汤有增加食糜在肠道内的消化时间,提高食糜的吸收效

表 3 苦木汤对仔猪生产性能的影响

组别	对照组	试验组 I	试验组 II
平均初重(kg/头)	20.75±0.63	20.43±0.47	20.27±1.26
平均末重(kg/头)	33.31±2.16	34.03±1.23	33.95±1.58
平均采食量(kg/头·日)	1.30±0.02	1.37±0.05	1.39±0.04
平均日增重(g/头·日)	598.07±42.23 ^{al)}	647.53±37.31 ^{b)}	652.27±45.18 ^{b)}
料肉比	2.17±0.23 ^{a)}	2.11±0.17 ^{b)}	2.13±0.18 ^{ab)}
成活率(%)	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
腹泻率(%)	3.46±0.39 ^{a)}	1.73±0.74 ^{b)}	2.04±0.35 ^{ab)}

1): 同列肩标字母不同,差异显著 ($P < 0.05$),反则差异不显著 ($P > 0.05$)

果,促進仔豬生長的功效。劉富國^[4]用苦木片預防和治療仔豬白痢病作了一些試驗,試驗結果表明通過對懷孕母豬產前3天開始服用苦木片,或產後哺乳母豬服用苦木片,都顯著降低仔豬白痢的發生。本試驗結果也證實苦木湯部分取代抗生素可顯著降低腹瀉率($P<0.05$)。王啟明^[5]用苦木湯劑對治療豬的感冒、無名高熱、中暑等疾病有效,尤其是治療豬感冒,有效率達98%以上。楊宗樺^[6]也應用以苦木為主要成分的中藥制劑,在家畜的內、外疾病的治愈率上取得了很好的臨床效果。表明苦木湯可改善動物的消化性能,提高動物免疫抗病能力及預防仔豬腹瀉的作用。

4 小結

在仔豬飼料中添加300~400 g/t的苦木湯,可顯著提高仔豬日增重($P<0.05$),降低仔豬腹瀉率。

參考文獻:

- [1] 朴香淑,李德發.中草藥飼料添加劑促進畜禽生長性能研究現狀及展望[J].飼料工業,2002,23(1):12-15.
- [2] 孫杰,王建設,田亞歲,等.中草藥飼料添加劑的應用現狀[J].中國動物保健,2010(2):74-76.
- [3] 馬麗莎.四川苦木科植物資源及其開發利用[J].四川林業科技,1997,18(4):36-39.
- [4] 劉富國.苦木片預防和治療仔豬白痢病效果初報[J].中國獸醫雜誌,2012(7):34.
- [5] 王啟明.苦木制劑在豬病上的應用[J].中獸醫學雜誌,2011(4):14.
- [6] 楊宗樺.苦木的臨床應用[J].中獸醫藥劑雜誌,1997(6):35.

·行業信息·

農業部將以蔬菜動物產品為重點開展風險隱患排查

農業部農產品質量安全監管局局長馬愛國16日表示,春節期間農產品質量安全保障要突出工作重點,開展風險隱患排查。以蔬菜和動物產品為重點,鎖定主產區和主銷區。

國務院新聞辦公室16日上午舉行新聞發布會,介紹春節期間食品安全保障情況。

馬愛國說,對於春節期間農產品質量安全的保障情況,農業部高度重視,及早地做出了部署和安排。總的要求就是在產品的數量上供應要充足,品種上要豐富多樣,質量上要保障安全。一個根本的目的就是讓老百姓在春節期間吃得好、吃得安全放心。

馬愛國指出,農業部圍繞着五個方面開展工作:

一是及早安排部署,加強督促指導。元旦前就印發了一個通知,對春節農產品質量安全保障工作進行了全面部署;隨後又在全國農產品質量安全監管視頻會議、全國畜禽屠宰行業管理視頻會議上進行了再次強調,同時兩次派出10個督導組,督促各地農業部門落实好相關監管措施。

二是突出工作重點,開展風險隱患排查。以蔬菜和動物產品為重點,鎖定主產區和主銷區,重點排查蔬菜生產基地、畜禽水產規模化養殖場、農產品收儲運場所、生豬定點屠宰場,重點防范違規使用高毒農藥、濫用抗生素、非法添加有毒有害物質等問題,堅決杜絕屠宰病死畜禽行為。在主銷區與食藥部門建立聯防聯控機制,加強對各類批發市場、展會、年貨市場的排查。

三是強化監督抽檢,加大執法力度。針對各地重點農產品、地方特色農產品,加大上市前的監督檢查和質量抽檢頻次和範圍。對發現的不合格產品和違法違規行為,及時依法進行查處;對涉嫌犯罪的,堅決移送司法機關。同時要求各地公布投訴舉報電話,強化公眾參與和社會監督。

四是加強產銷銜接,實施聯防聯控。強化營銷促銷,確保節日期間農產品供應充足。推動農產品產地、銷地實施質量安全監管跨區聯動,加強信息互通和報送,健全農產品准出准入機制,維護市場秩序,保障農產品消費安全。

五是加強應急值守,妥善處置突發事件。前幾天,農業部修訂了《農產品質量安全突發事件應急預案》,強化應急值守和信息報送機制,要求各地加強值守,暢通信息渠道,落實工作責任,強化節日值守,確保發生突發問題後能及時妥善處置。(信息來源:中國新聞網)

三种抗原检测 H₁N₁ 猪流感病毒抗体的比较

杨倩¹, 薛春宜¹, 朱道中², 李晓明¹, 曹永长^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510006;

2. 广东出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 广东 广州 510623)

摘要: 本研究采用昆虫杆状病毒表达系统制备了 H₁N₁ 亚型猪流感病毒的 HA 蛋白、类病毒脂质体、病毒样颗粒, 分别作为抗原进行包被, 采用间接酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测 H₁N₁ 猪流感病毒抗体。特异性实验结果表明, 单独表达的 HA 蛋白和类病毒脂质体特异性良好, 但是病毒样颗粒不能区分不同亚型的流感病毒; 敏感性实验结果表明, 类病毒脂质体作为抗原的敏感性最好; 重复性实验结果表明, 三种抗原的重复性好, ELISA 实验的批间和批内变异系数均小于 10%; 稳定性实验结果表明, 在 4℃ 可至少稳定保存 1 年。综上所述, 类病毒脂质体有较高的免疫反应性, 与灭活全病毒相比有更好的安全性, 在抗体水平测定方面有较好的应用前景。

关键词: 昆虫杆状病毒表达系统; 猪流感病毒; 类病毒脂质体; 抗体检测

中图分类号: S852.43

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0016-04

Comparison of Three Methods for Detection of Antibodies to H₁N₁ Swine Influenza Virus

Yang Qian¹, Xue Chunyi¹, Zhu Daozhong², Li Xiaoming¹, Cao Yongchang^{1*}

(1.State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University,Guangzhou 510006,China;2. Technical

Center,Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou,510623,China)

Abstract: HA protein, virus-like liposomes, and virus-like particles, expressed by Bac-to-Bac baculovirus expression system, were coated as antigens to detect the H1N1 swine influenza virus antibody using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of specificity experiments showed that the single-expressed HA protein and virus-like liposomes had good specificity, but the virus-like particles could not distinguish different subtypes of influenza virus. The results of sensitivity experiments showed that virus-like liposomes had the best sensitivity. The results of repetitive experiments showed that the repetitiveness of the three methods was high, and the coefficient of variation within-run and between-run were less than 1%. The results of stability experiments showed that three antigens could be stable at 4 °C for at least one year. In a word, the virus-like liposome has strongest immunoreactivity, and is safer than the inactivated whole influenza virus. Thus it represents a promising method in detection of H1N1 antibodies.

Key words: Bac-to-Bac baculovirus expression system;swine influenza virus;virus-like liposome;antibody detection

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由正粘病毒科、流感病毒属的 A 型流感病毒引起的一种猪的急性、热性和高度接触性呼吸道传染病。由于猪的呼吸道上皮细胞表面同时具有人流感病毒

和禽流感病毒受体的特殊结构, 决定了猪流感病毒能感染人和禽, 人流感病毒和禽流感病毒同时也能感染猪^[1,2]。因此, 猪成为猪流感病毒、禽流感病毒和人流感病毒发生基因重组或重排的重要

收稿日期: 2013-11-28

*: 通讯作者

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2011IK004)

宿主,其在流感病毒的种间传播方面扮演了十分重要的角色。自1991年中国首次分离到古典 H₁N₁ 亚型猪流感病毒以来,猪流感不断发生,并有愈演愈烈的趋势。在亚洲、欧洲和美国已发生多起人感染古典 H₁N₁ 亚型猪流感病毒的病例,并有病例出现死亡^[3,4]。因此,猪流感具有极其重要的公共卫生学上的意义。

酶联免疫吸附试验(ELISA)是检测猪流感病毒较为常用的实验室方法,可用于抗原或抗体检测,适合猪流感疑似病例的快速确诊,在当前得到广泛应用。由于流感病毒作为抗原进行包被存在安全性问题,因此现在的研究集中在利用流感病毒的特异性蛋白或者单克隆抗体来建立检测流感病毒的 ELISA 方法。本研究制备了 H₁N₁ 亚型流感病毒 HA 蛋白、类病毒脂质体、病毒样颗粒,分别作为抗原进行包被,通过 ELISA 检测 H₁N₁ 猪流感病毒抗体。特异性试验、敏感性试验、重复性试验和稳定性试验结果表明,类病毒脂质体有较高的免疫反应性,与灭活全病毒相比有更好的安全性,在抗体水平测定方面有较好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 抗原的制备

1.1.1 材料 质粒 pFastBacDual-HA 和 pFast-BacDual-HA-M1 由本实验室构建并保存; Sf9 细胞由本实验室保存; Grace' 培养基和 Sf-900 II SFM 分别购自 Invitrogen 公司和 GIBCO 公司(美国)。

1.1.2 重组杆状病毒的构建 将 pFastBacDual-HA 和 pFastBacDual-HA-M1 转化大肠杆菌 DH-10Bac 感受态细胞进行转座反应。经过蓝斑筛选和抗生素抗性筛选后,提取阳性质粒,利用 PCR 技术鉴定转座质粒 rBacmid。参考 Invitrogen 公司 Bac-To-Bac 表达系统技术手册(Bac-to-Bac Baculovirus Expression System),将质粒 rBacmid-HA、rBacmid-HA-M1 和脂质体混合,接种于对数生长期的 Sf9 昆虫细胞,置于 27℃ 培养 5 h 后,弃去原混合物,并用新鲜的培养基洗涤 2 次,然后加入 Grace' 完全培养基,28℃ 继续培养 72 h,收获培养基和细胞,上清即为 P1 代,4℃ 保存备用。将 P1 代病毒感染 Sf9 昆虫细胞,继续扩大培养,采用蚀斑试验确定毒种滴度,于 -80℃ 保存备用。

1.1.3 H₁N₁ 猪流感病毒样颗粒的制备、纯化和鉴

定 将纯化后的重组杆状病毒 rBacmid-HA-M1 以 MOI=5 感染昆虫细胞,28℃ 培养 72 h 后,收获上清。10 000 rpm,4℃ 离心 30 min,取上清。40 000 rpm,4℃ 离心 2 h,沉淀用 PBS 重悬。将浓缩液上样于梯度为 20%~60%的蔗糖梯度液面上,27 000 rpm,4℃ 离心 2 h,40 000 rpm,4℃ 离心 1 h 脱糖。通过 Western blot、血凝试验、透射电镜实验进行鉴定。

1.1.4 H₁N₁ 猪流感类病毒脂质体的制备和鉴定 将纯化后的重组杆状病毒 rBacmid-HA-M1 以 MOI=5 感染昆虫细胞,28℃ 培养 72 h 后,收获细胞。将细胞用 PBS 洗涤 3 次,离心后去上清。将沉淀用 200 μL 预冷的 PBS 重悬,反复冻融 3 次后在冰水浴中按如下程序超声波破碎 30 min,然后静置 10 min,3000 rpm 离心 5 min,取上清。鉴定方法同病毒样颗粒。

1.1.5 H₁N₁ 猪流感病毒 HA 蛋白的制备和鉴定 将纯化后的重组杆状病毒 rBacmid-HA 以 MOI=5 感染昆虫细胞,28℃ 培养 72 h 后,收获细胞。将细胞用 PBS 洗涤 3 次,离心后去上清。向沉淀加入 200 μL 细胞裂解液,混匀,然后在冰上静置 30 min,3000 rpm 离心 5 min,取上清。通过 Western blot 和血凝实验进行鉴定。

1.2 间接 ELISA 的建立

1.2.1 最适抗原包被浓度和对照血清最佳稀释度的确定 以单独表达的 HA 蛋白、类病毒脂质体、病毒样颗粒作为抗原分别进行包被。采用方阵试验进行测定:抗原用包被液进行稀释,每 100 μL 含抗原量分别为 10ng、20ng、30ng、40ng、50ng、60ng、70ng、80ng、90ng、100ng、110ng、120ng,加入酶标板,100 μL/孔,4℃ 过夜;洗涤后 37℃ 封闭 1 h,洗涤后将阴、阳性血清用稀释液作 1:10、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 稀释,100 μL/孔,设空白对照,37℃ 温育 1 h;洗涤后加入驴抗鸡 IgG-HRP (1:5000 稀释),100 μL/孔,37℃ 温育 1 h;洗涤后加显色液,100 μL/孔,37℃ 温育 10 min,加 2M H₂SO₄ 终止反应,50 μL/孔。

将酶标仪置于 450 nm 处读取 OD 吸光值。取阳性血清孔的 OD 值接近 1.0, P/N>2.0 的血清最大稀释度作为抗原及对照血清的最适工作浓度。

1.2.2 间接 ELISA 临界值的判定 间接 ELISA 方法的判定标准: 随机取抗原样品进行 ELISA 检测。当(样品 OD 值-空白对照 OD 值) / (阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值) ≥ 2.1 时为阳性。

1.3 特异性试验

采用实验建立的间接 ELISA 方法, 用病毒样颗粒、类病毒脂质体、HA 蛋白分别作为抗原对 H₃N₂ 亚型流感病毒阳性血清、H₅N₁ 亚型流感病毒阳性血清、H₉N₂ 亚型流感病毒阳性血清、新城疫病毒阳性血清以及 H₁N₁ 亚型流感病毒阳性血清和阴性血清进行检测, 比较检测结果。

1.4 敏感性试验

取 3 份 H₁N₁ 亚型猪流感阳性血清, 进行系列稀释后, 分别采用病毒样颗粒、类病毒脂质体、HA 蛋白作为抗原进行检测, 记录各阳性血清在不同抗原包被时的检测终点(阳性反应最高稀释度), 比较 3 种方法对同一组样品的检测灵敏度(最高稀释度)。

1.5 重复性试验

取 H₁N₁ 亚型猪流感病毒阳性血清和阴性血清各 1 份, 将 3 个不同时间制备的病毒样颗粒、类病毒脂质体、HA 蛋白分别作为抗原进行 3 次检测, 分别计算批内变异系数和批间变异系数。

1.6 保存稳定性实验

将包被用的抗原冻干成粉末, 分别检测其放置于 37 °C 前和置 37 °C 环境中 4 d 和 8 d 后的 OD 吸光值, 比较前后 3 次的检测结果。

2 结果

2.1 抗原的鉴定

Western blot 检测到 H₁N₁ 亚型流感病毒样颗粒、类病毒脂质体、单独表达 HA 蛋白的相应条带, HA、M1 蛋白大小分别是 70 KD 和 30 KD。透射电镜可以观察到病毒样颗粒(图 1)和类病毒脂质体(图 2)的形态。

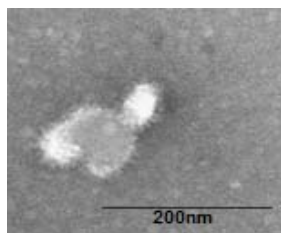


图 1 H₁N₁VLPs 电镜负染照片

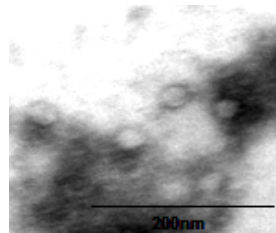


图 2 H₁N₁ 类病毒脂质体电镜负染照片

2.2 抗原最佳包被浓度与对照血清最佳稀释度的确定

通过方阵实验进行间接 ELISA 方法的检测, 获得抗原最佳包被浓度为 100 ng/孔, 确定 H₁N₁ 血清 1:500 稀释度为最佳工作浓度, 二抗最佳稀释度为 1:5000。

2.3 间接 ELISA 临界值的判定结果

通过随机取抗原样品进行 ELISA 检测, 结果显示: 阴性对照的 OD 吸光值的平均值为 0.120, 空白对照的平均值为 0.047。

2.4 特异性试验

分别用类病毒脂质体、HA 蛋白和 H₁N₁ 亚型猪流感全病毒灭活物作为抗原, 对 H₃N₂、H₅N₁、H₉N₂ 亚型流感病毒阳性血清、新城疫病毒阳性血清以及 H₁N₁ 亚型流感病毒阴性血清检测结果均为阴性, 对 H₁N₁ 亚型流感病毒标准阳性血清检测结果为阳性。但是病毒样颗粒作为抗原对 H₃N₂ 亚型流感病毒阳性血清、H₅N₁ 亚型流感病毒阳性血清、H₉N₂ 亚型流感病毒阳性血清均为阳性, 无法区分不同亚型的流感病毒。结果如表 1。

表 1 特异性实验结果

抗血清	病毒样颗粒	类病毒脂质体	HA 蛋白
H ₁ N ₁ 阴性血清	-	-	-
H ₁ N ₁ 标准阳性血清	+	+	+
H ₃ N ₂ 阳性血清	+	-	-
H ₅ N ₁ 阳性血清	+	-	-
H ₉ N ₂ 阳性血清	+	-	-
新城疫阳性血清	-	-	-

2.5 敏感性试验

HA 蛋白作为抗原的敏感性低于病毒样颗粒和类病毒脂质体作为抗原的敏感性。结果如表 2。

表 2 敏感性试验结果

血清	病毒样颗粒	类病毒脂质体	HA 蛋白
1	1:16000	1:16000	1:8000
2	1:8000	1:16000	1:8000
3	1:8000	1:8000	1:8000

2.6 重复性试验

批内、批间系数均小于 10%，说明重复性较好。结果如表 3 和表 4。

2.7 保存稳定性实验

比较前后 3 次检测结果，显示无显著差异。

按 37 °C 放置 1 d 相当于 4 °C 放置 1.6 个月计算，该试剂盒在 4 °C 下至少稳定 1 年。

3 讨论

本研究制备了 H₁N₁ 亚型流感病毒的 HA 蛋白、类病毒脂质体和病毒样颗粒，分别作为抗原用于 H₁N₁ 猪流感病毒抗体的 ELISA 检测。采用病毒样颗粒和类病毒脂质体用于检测是基于安全性的考虑，利用表达的蛋白，形成不含病毒核酸的类病毒颗粒，在形态上与真实病毒相似，来代替病毒进行相关的研究。

对于病毒样颗粒的纯化在许多文献中均有

表 3 批内变异系数

批次	血清样品	病毒样颗粒			类病毒脂质体			HA 蛋白		
		平均数	标准差	变异系数 (%)	平均数	标准差	变异系数 (%)	平均数	标准差	变异系数 (%)
1	阴性血清	0.112	0.009	8.0	0.114	0.005	4.4	0.111	0.009	8.1
	阳性血清	0.779	0.045	5.8	0.806	0.031	3.9	0.812	0.022	2.7
2	阴性血清	0.111	0.010	9.0	0.124	0.012	9.7	0.109	0.007	6.4
	阳性血清	0.799	0.012	1.5	0.878	0.046	5.2	0.842	0.038	4.5
3	阴性血清	0.113	0.008	7.1	0.115	0.005	4.3	0.116	0.011	9.5
	阳性血清	0.927	0.088	9.5	0.836	0.025	3.0	0.885	0.049	5.5

表 4 批间变异系数

项目	阴性血清			阳性血清		
	平均数	标准差	变异系数 (%)	平均数	标准差	变异系数 (%)
病毒样颗粒	0.112	0.001	0.89%	0.835	0.080	9.6%
类病毒脂质体	0.118	0.006	4.7%	0.840	0.036	4.3%
HA 蛋白	0.112	0.004	3.2%	0.846	0.037	4.3%

报道，现在已经形成了较为成熟的纯化方法。但对于类病毒脂质体的纯化研究较少，张耀洲等^[5,6]通过分离、超滤的方法，能获得带有 HA 蛋白标签的宿主细胞剩余膜，再经过 HPLC 和质谱方法分析，鉴定并找出目标膜蛋白。这些对今后类病毒脂质体的研究都有较大的启迪，有助于未来对于类病毒脂质体的相关研究的开展。

现在对于病毒样颗粒的研究主要集中在疫苗的开发，有些病毒样颗粒疫苗已经成功应用于临床：HPV 四价病毒样颗粒疫苗已经获得批准并投放到市场^[7]，HBV 病毒样颗粒的预防性疫苗也研制成功并获准投放到市场中^[8]。除此以外，IBDV、NDV、SARS 等病毒样颗粒的疫苗都有较为深入的研究

与开发^[9]。本文从免疫检测的角度出发，希望将病毒样颗粒和类病毒脂质体在抗体抗原检测方面发挥作用。实验表明，类病毒脂质体在免疫测定方面可能有更为良好的表现。在本实验中，病毒样颗粒在特异性反应的效果不理想，原因可能是因为 M1 蛋白较为保守，干扰了不同亚型的区别。而类病毒脂质体由于只有 HA 蛋白的存在，因此能较好的分型。同时类病毒脂质体由于在形态上类似真实的病毒，因此在敏感度等方面会优于用传统方法处理的单独表达 HA 蛋白。用类病毒脂质体作为 ELISA 检测用抗原，快速、敏感、特异，可以为猪流感的诊断和监控起到很好的作用。

参考文献:

[1] Schultz U, Fitch W M, Ludwig S, et al. Evolution of pig influenza viruses[J]. *Virology*, 1991, 183(1):61-73.

[2] Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(Pt 9):2183-2188.

[3] Wells D L, Hopfensperger D J, Arden N H, et al. Swine influenza virus infections. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission [J]. *JAMA*, 1991, 265(4):478-481.

[4] Kimura K, Adlakha A, Simon P M. Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host [J]. *Mayo Clin Proc*, 1998, 73(3):243-245.

[5] 张耀洲, 陈健, 吕正兵, 等. 基于昆虫病毒出芽后细胞膜及细胞器膜蛋白的分离方法[P]. 中国专利:101358206, 2009-02-04.

[6] 张耀洲, 陈健, 吕正兵, 等. 一种制备动物细胞膜及细胞器的膜蛋白的方法[P]. 中国专利:CN101348801, 2009-01-21.

[7] Keim B. Controversy over cervical cancer vaccine spurs safety surveillance[J]. *Nat Med*, 2007, 13(4):392-393.

[8] Wheeler C M, Tomassini J E, Sattler C A, et al. Safety and immunogenicity of co-administered quadrivalent human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) and hepatitis B (HBV) vaccines [J]. *Vaccine*, 2008, 26(5):686-696.

[9] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens[J]. *Trends in Microbiology*, 2003, 11(9):438-444.



· 行业信息 ·

三部委联合宣传贯彻《畜禽规模养殖污染防治条例》

1月6日,国务院法制办、环境保护部、农业部联合召开《畜禽规模养殖污染防治条例》学习贯彻电视电话会议。国务院法制办副主任甘藏春、环境保护部副部长李干杰、农业部副部长于康震,分别就学习贯彻《条例》作了讲话。

甘藏春指出,《条例》的出台是我国加强生态文明制度建设的又一最新成果,是利用法治手段促进畜禽养殖污染防治与畜牧业健康发展的积极探索,是推动实现畜禽养殖业发展与农村环境保护和谐统一的法制保障。下一步,有关部门要创新宣传方式方法、积极主动做好服务、切实严格依法行政,贯彻实施好《条例》规定的各项制度,有效解决畜禽规模养殖污染问题,改善农村环境面貌,为建设山青、水净、天蓝的社会主义新农村作出贡献。

李干杰对《条例》颁布实施的重要意义,以及《条例》的基本思路、主要内容和亮点、精神内涵进行了全面阐释。同时,对环保部门今后一段时间贯彻落实《条例》的主要工作做了部署,一要抓好《条例》的学习和宣传;二要进一步摸清畜禽养殖污染防治工作的家底;三要推动相关政策措施的出台,如推动省级政府尽快确定本省养殖场和小区的产能规模标准、完成禁养区划定、出台有利于畜禽粪便等废弃物综合利用的财税政策等;四要抓好污染物减排重点工程建设;五要继续加强畜禽养殖业日常环境监管,六要加强畜禽养殖业污染治理技术服务和支撑。

于康震强调,各级农牧部门要在毫不松懈地抓好畜牧业生产、保障畜产品市场有效供给的同时,以畜禽养殖废弃物无害化处理与资源化利用为抓手,立足指导和服务职能,积极稳妥推进畜禽规模养殖污染防治,努力实现生产发展、资源节约、生态友好、优质安全的目标。于康震指出,加强畜禽规模养殖污染治理是现代畜牧业建设的内在要求。近年来,各地农牧部门大力提升畜禽养殖废弃物处理利用水平,加大沼气工程建设力度,积极推广使用有机肥。

狠抓病死畜禽无害化处理,为规模养殖污染治理创造了良好条件。于康震要求,今后一个时期,各级农牧部门要以《条例》出台实施为契机,积极做好《条例》宣传贯彻工作,优化畜牧业区域布局,加快转变畜牧业发展方式,加强技术指导和服务,加强病死畜禽无害化处理,加大政策支持力度,促进畜牧业持续健康发展,努力实现现代畜牧业建设和畜禽规模养殖污染治理的双赢。(信息来源:中国畜牧兽医报)

丹顶鹤全群驱虫效果分析

梁金华¹, 冼永杰², 蓝伟强²

(1. 肇庆市动物防疫监督所, 广东 肇庆 526040; 2. 肇庆市星湖园林建设管理局, 广东 肇庆 526040)

摘要: 用驱虫康对星湖湿地公园里的丹顶鹤进行全群驱虫, 结果只驱出卷棘口吸虫一种寄生虫。经统计, 丹顶鹤群感染卷棘口吸虫的比例为 67.9% (38/56), 全群驱虫取得良好效果。

关键词: 丹顶鹤; 驱虫; 效果分析

中图分类号: S859.79⁵

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0021-02

丹顶鹤是我国一级保护动物。肇庆市星湖湿地公园共饲养有 56 只丹顶鹤, 是我国南方规模最大的丹顶鹤人工饲养基地。从 2010 年起发现有个别丹顶鹤的粪便中有寄生虫, 同时, 在对近年死亡丹顶鹤的解剖过程中也发现有部分鹤的肠道有寄生虫。为预防控制好鹤群的寄生虫病, 2013 年下半年, 湿地公园对鹤群进行了一次全群驱虫。现将驱虫结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

驱虫康(含双羟萘酸噻嘧啶、阿苯哒唑、吡喹酮), 每片含主药 87 mg。生产日期 2013 年 4 月 23 日, 有效期至 2018 年 5 月。香港幸芝动保有限公司产品。

1.2 方法

选择晴朗天气的早晨, 在还没有喂食早餐的前提下, 按 10 mg/kg 的剂量投药。通过将药片塞在小块食物内, 由鹤自由啄食, 每只鹤 1 份。不愿自由啄食的鹤人工喂服。已配对的丹顶鹤圈养在一个栏舍内, 为避免应激不再分栏; 没有配对的丹顶鹤单独圈养于不同栏舍内。圈养 4 h, 期间观察粪便及寄生虫的排出情况。

2 结果

2.1 排出虫体情况

绝大部分丹顶鹤在喂食驱虫药后 2~3 h 排出虫体, 最快的 1 h 即排出虫体, 见图 1。通过检查丹顶鹤排出的所有寄生虫, 发现均为一种红色卷曲虫体, 虫体长 10.6~20.2 mm, 宽 1.3~2.9

mm^[1], 见图 2。

2.2 虫体观察

虫体在低倍显微镜下观察, 见虫体的头部有棘, 口吸盘位于虫体的最前端, 稍弯向腹吸盘, 腹吸盘大于口吸盘, 直径约为口吸盘的 2~3 倍。高倍显微镜下, 可清晰地看见虫体体表有小刺; 虫体中央有圆盘形卵巢, 子宫弯曲在卵巢前方, 内有虫



图 1 粪便及虫体



图 2 虫体长度

卵; 辜丸呈椭圆形, 前后排列, 位于卵巢后方; 虫体两侧、腹吸盘后有卵黄腺延伸至虫体后端。初步诊断为卷棘口吸虫^[2]。

2.3 虫卵检查

收集丹顶鹤粪便, 选择孔径 60 目的铜筛过滤粪便, 取粪便滤液离心后弃去上清液, 吸取沉渣镜检。虫卵呈浅黄色, 椭圆形, 见图 3。根据虫卵形态, 判断为卷棘口吸虫虫卵。

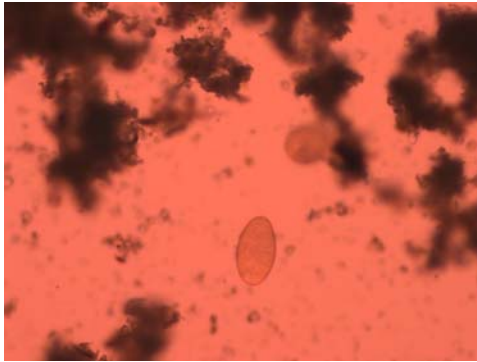


图 3 显微镜下虫卵形态

3 讨论

3.1 驱虫方式

肠道驱虫是防治肠道寄生虫感染的主要手段, 也是控制传染源的重要措施。从驱虫结果看, 有 67.9% 的丹顶鹤驱出了寄生虫, 说明服用驱虫药有良好的防治效果, 因此应继续采取全群驱虫为主的防治措施。

3.2 驱虫药的选择

此次驱虫使用的驱虫康主要成分为双羟萘酸噻嘧啶、阿苯达唑和吡喹酮, 对线虫、吸虫、绦虫均有良好效果, 加上服用剂量合理, 应能驱出丹顶鹤肠道内的线虫、吸虫和绦虫。通过对粪便的观察及统计, 发现有 38 只丹顶鹤排出的粪便有卷棘口吸虫, 粪便中虫体少则 1~2 条, 最多的有 23 条, 说明鹤园内的丹顶鹤感染卷棘口吸虫概率较高。本次驱虫发现所有丹顶鹤的粪便中只有卷棘口吸虫一种寄生虫虫体, 未发现有线虫和绦虫虫体。通过粪便检查也是只发现有卷棘口吸虫虫卵, 没有其他虫卵。

3.3 感染源分析

从丹顶鹤的食物来看, 丹顶鹤平常主要喂泥鳅、鱼肉、高粱、玉米等。本报告排除吃鱼肉、泥鳅感染的可能性, 因为湿地公园还饲养蓑羽鹤, 同样饲喂鱼肉和泥鳅, 本次驱虫未驱出卷棘口吸虫。由于丹顶鹤居住在星湖的湖边, 可以自由在湖边觅食, 采食到螺蛳的机会较多。螺蛳是卷棘口吸虫的中间宿主^[1], 从今年的丹顶鹤病例解剖也发现肌胃中有螺体, 推测丹顶鹤有可能吞食了螺蛳而感染。

参考文献:

- [1] 李国清. 兽医寄生虫学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999.
- [2] 李清武, 姜建民, 陈明非, 等. 丹顶鹤卷棘口吸虫病[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(6): 53.



· 行业信息 ·

华中农研发出首个猪肉药物残留检测国际标准

1月9日, 记者从华中农业大学获悉, 该校动科动医学院袁宗辉教授领衔的研究团队的“猪可食性组织中喹烯酮最高残留限量标准制定”研究成果, 能通过对产品的检测, 判断猪肉喹烯酮残留是否超标, 从而保障产品安全, 并让使用喹烯酮的养殖者、检测机构和监管部门有了科学明确的监控对象与判断标准。

喹烯酮是我国自主研发的一类新兽药, 是我国养殖业中应用最广泛的饲料添加剂之一。虽然喹烯酮尚未证实直接对人体或环境造成危害, 但它已被证明存在遗传毒性(致畸、死胎率增高), 对环境生物也存在潜在危害作用。

袁教授的这一研究成果不仅能直接检测猪肉中喹烯酮含量, 还能通过屠宰前的抽样检测, 确定停药时间以保证上市猪肉的安全。

这项成果填补了喹烯酮在动物性产品中安全控制标准的国际空白, 是我国首例自主研究确定的食品安全标准, 实现了我国兽药食品安全性标准制订的零突破。同时, 首次按国际标准进行了兽药安全性标准制定, 提升了我国在国际标准制修订舞台上的地位与话语权。(信息来源: 荆楚网)

浅谈基层如何进行猪“瘦肉精”残留检测

范瑞环¹, 罗英娇¹, 周森松², 黄柳明¹, 钟蕴珠¹

(1. 梅县动物卫生监督所, 广东 梅县 514700; 2. 梅县松源镇农业服务中心, 广东 梅县 514700)

中图分类号: S851.33

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0023-01

瘦肉精是一种肾上腺类 β 激动剂。因为它能够促进瘦肉生长、抑制动物脂肪生长,所以称之为“瘦肉精”。这类药物主要是克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇等。我国俗称的“瘦肉精”是指克伦特罗。当它大剂量用于家畜饲养时,即有显著的营养“再分配效应”——促进动物体蛋白质沉积、促进脂肪分解抑制脂肪沉积,显著提高胴体的瘦肉率和提高饲料转化率。此类药物在猪体内代谢慢,易残留。养殖户为提高猪的瘦肉率,在饲喂时添加了过量的盐酸克伦特罗,就会造成生猪上市时体内盐酸克伦特罗残留超标。当人食用了含有“瘦肉精”的猪肉和内脏后,可能出现面颈和四肢肌肉颤动、手抖,甚至不能站立,腹痛、腹泻、头晕、乏力,心率失常、心动过速等症状,俗称“瘦肉精”中毒。我国法律明令禁止在畜牧生产中添加使用“瘦肉精”等违禁药物。畜牧部门如何更好地在检疫检查中做好“瘦肉精”等违禁药物的检测,以猪的克伦特罗残留为例,简单介绍一些实践操作,供同行参考。

1 尿样的采集

1.1 准备工具

勺子、样品瓶、喷漆和封条等。勺子采用普通的塑料勺将勺柄用木条接长,一般长度为0.9~1.2 m比较适用。短了离猪只太近易吓到猪,太长了又不方便操作。长柄勺用来采集尿样;样品瓶用来装尿样;喷漆用来在猪身上做编号标记;封条用于封存尿样。

1.2 屠宰场的尿样采集

现在屠宰场一般都会对运载来的每批猪随机抽取10%~30%尿样,用克伦特罗速测卡进行现场检测。刚运载来的猪只赶下车后,大部分猪只会排尿,这时候比较容易采集尿样。如果是采集存栏的

猪只尿样,应先让猪群休息2 h以上再采集尿样会比较容易。采集猪尿样时,可用水管放水,尽量不淋到猪身上,猪只听到水声应激和喝水后也较易排尿。采集完尿样后用喷漆在猪身上做编号标记。

1.3 养殖场的尿样采集

在养殖场采集尿样,一般是采集商品猪群的大猪。在采集尿样时让猪群休息2 h以上后再赶起猪群,用水管放水,尽量不淋到猪身上(减少采样时的污染),等猪只排尿时直接进行采集。采集完尿样后应用喷漆在猪身上做编号标记。

2 尿样的封样与注意事项

尿样应是直接采集的,而不应在地上或其它地方采集,尽量减少其它物质污染尿样。尿样一式3份,每份尿量不少于20 mL。采集后将尿样装入样品瓶并贴上标签,每份尿样对应每头猪只身上的编号标记。将尿样用自封袋装好后,用签名及盖章的封条将尿样封装好。封样时应至少有两名以上畜牧部门工作人员和畜主在场见证。畜牧部门带走2份(1份用于检测,1份留样),畜主保留1份。

3 尿样的检测

3.1 胶体金标记快速检测

本试验为竞争抑制法,将氯金酸用还原法制成一定直径的金溶胶颗粒标记抗体。以硝酸纤维素膜为载体,利用了微孔膜的毛细管作用,滴加在膜条一端的尿样慢慢向另一端渗透。在移动的过程中,会发生相应的抗原抗体反应,并通过免疫金的颜色而显示出来。尿样中的盐酸克伦特罗在流动的过程中与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合,抑制了抗体和硝酸纤维素(NC)膜检测线上盐酸克伦特罗-BSA偶联物的结合,使检测线不显颜

(下转第27页)

新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 检测方法建立与初步应用

孔 丰¹, 袁远华², 肖成谋³, 黄淑坚^{3*}

(1. 遂溪县遂城畜牧兽医站, 广东 湛江 524300; 2. 大沥镇农林服务中心, 广东 佛山 528231;
3. 佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 为建立一种能够快速检测新型鸭呼肠孤病毒 (NDRV) 的方法, 本研究参考 GenBank 上登录的 NDRV S3 基因保守序列设计特异性引物。经条件优化后, 建立了检测 NDRV 的 RT-PCR 方法。对其特异性、敏感性和重复性进行检验。结果显示: 该方法仅能从 NDRV 分离毒中扩增到与预期大小相符, 长度为 298 bp 的特异性目的片段, 检测灵敏度达到 83.4 pg 病毒 RNA; 而其它病毒: 番鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒、鸭病毒性肝炎病毒、鸭瘟病毒、鸭新城疫病毒和禽流感病毒等样品的扩增结果均为阴性。采用该方法对在广东不同地区采集的 15 份鸭病料样品进行检测, NDRV 阳性率为 53.33%。表明建立的 RT-PCR 方法特异性强、敏感度高, 可用于 NDRV 的临床诊断和流行病学调查。

关键词: 新型鸭呼肠孤病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号: S852.659.4

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0024-04

Establishment and Application of RT-PCR Method for Detection of NDRV

Kong Feng¹, Yuan Yuanhua², Xiao Chengmou³, Huang Shujian^{3*}

(1. Suicheng Animal Husbandry and Veterinary Medicine Station, Suixi County, Zhanjiang 524300, China; 2. Dali Town Agricultural Service Center, Foshan 528231, China; 3. College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: To develop a method for detection of new-type duck reovirus (NDRV), a RT-PCR method was established with 1 pairs of specific primers designed based on the conserved sequences of S3 gene of NDRV. RT-PCR results showed that a 298 bp specific fragment could be detected only from the RNA of NDRV-QY strain, and the sensitivity of RT-PCR reached to 83.4 pg NDRV RNA. Fifteen tissue samples of sick ducks from different areas of Guangdong province were detected respectively by the RT-PCR and the positive rate was 53.33% (8/15) for NDRV which indicated that the RT-PCR method for detecting NDRV was rapid, specific and sensitive, and could be used in clinic diagnoses.

Key words: New-type duck reovirus; RT-PCR; detection

新型鸭呼肠孤病毒 (New-type duck reovirus, NDRV) 病, 是一种以肝脏不规则坏死、出血斑/点和心肌、腔上囊出血为主要特征的新疫病, 其发病率和病死率差异较大, 但患病鸭日龄愈小, 发病率、病死率愈高。本病最早由陈少莺等报道^[1]。随后在我国各地也报道了此病, 并从感染组织中分离到病毒^[2-4]。2005年冬季以来, 该病在福建、广东、浙江、安徽等地番鸭、半番鸭、北京鸭、麻鸭群中相继暴发。因该病病因不明, 缺乏有效的防治措施而迅速蔓延, 极大地威胁着养鸭业的发展^[5]。目

前该病的诊断只能采用病毒分离和血清学方法。但 these 方法繁琐、费时, 不适用于本病的快速诊断^[6]。王劭等^[7]研究证实 NDRV S3 基因存在一个变异区 (390~975 nt)。因此, 本实验根据已发表的 NDRV NP03 株 S3 基因序列 (GenBank 登录号: GQ888710) 设计了 1 对特异引物, 建立了针对新型鸭呼肠孤病毒 S3 基因的 RT-PCR 检测方法, 为临床快速诊断及分子流行病学调查提供有效手段。

1 材料与方法

1.1 病毒、病料及禽胚

收稿日期: 2013-12-26

*: 通讯作者

新型鸭呼肠孤病毒 (NDRV-QY)、鸭病毒性肝炎病毒 (DHV)、鸭瘟病毒 (DPV)、鸭新城疫病毒 (DNDV)、禽流感病毒 (AIV) 由本实验室分离鉴定并保存; 番鸭呼肠孤病毒 (MDRV-S12), 引自福建农林院畜牧兽医研究所; 禽呼肠孤病毒 (ARV-S1133), 引自中国兽药监察所。病料为采集自广东不同地区疑似发病鸭病变组织。11~12 d 非免疫鸭胚和 8~10 d 非免疫鸡胚均购自广东天农食品有限公司。

1.2 主要试剂

RNAiso Reagent, 购自美国 Invitrogen 公司; DNA 提取试剂盒, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 反转录试剂盒、Premix ExTaq™ Version 2.0、DNA Marker (DL2000) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 病毒的增殖

将 NDRV-QY、MDRV-S12、DHV、DPV、DNDV、ARV-S1133 病毒液分别接种于 12 d 龄鸭胚和 9 d 龄鸡胚尿囊腔, 置 37 °C 生化培养箱恒温孵化, 分别收集 24 h 后死亡的鸭胚和鸡胚尿囊液, -20 °C 保存备用。

1.4 引物的设计与合成

参照 GenBank 中登录的 NDRV S3 基因序列 (登录号 GQ888710), 利用 Primer5.0 引物设计软件和 BLAST 检索工具, 设计 1 对特异性引物 (见表 1), 由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 引物序列

病毒	引物	序列	预期片段大小
NDRV	N1	5'-GAAGACGTTATGGGATATTGAAGAG-3'	298 bp
	N2	5'-AGTTTCAGCGATATCCTGAGGT-3'	

1.5 病毒核酸的提取

按照 Trizol Reagent RNA Kit 的使用说明书抽提病毒总 RNA; DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。

1.6 NDRV RT-PCR 检测方法的建立

以 NDRV 的反转录产物为模板建立 PCR。采用 25 μL 反应体系: Primix Ex Taq™ 12.5 μL、NDRV 上下游引物 (10 pmol/μL) 各 1 μL、NDRV 的 cDNA 模板为 2 μL、无菌 ddH₂O 8.5 μL。反应条件为: 94 °C 预变性 4min; 94 °C 变性 30s, 54 °C 退火

30s, 72 °C 延伸 30s, 35 个循环; 72 °C 延伸 8min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统观察结果。

1.6.1 引物浓度的确定 将 NDRV 以 4pmol/μL、6pmol/μL、8pmol/μL、10pmol/μL、12pmol/μL、14pmol/μL 上下游引物和病毒 cDNA 进行 PCR 扩增, 筛选最佳引物浓度。

1.6.2 退火温度的确定 NDRV 的 cDNA 分别采用 52 °C、53 °C、54 °C、55 °C、56 °C、57 °C 的退火温度进行 PCR 反应, 筛选最佳退火温度。

1.7 特异性试验

以 DPV 的 DNA、NDRV-QY、MDRV-S12、ARV-S1133、DHV、DNDV、AIV 的 cDNA 为模板, 用已确定的最佳条件进行 RT-PCR 反应, 并设阴性对照。

1.8 敏感性试验

提取 NDRV-QY 的 RNA, 测其含量后, 将其核酸按 10 倍梯度稀释, 用已确定的最佳条件进行 RT-PCR 反应, 并设阴性对照。

1.9 临床样品检测

对从广东地区各鸭场采集的 15 份病理表现为肝、脾肿大, 不规则坏死和出血的病死雏鸭的肝脏、脾脏、心脏等样品, 用灭菌生理盐水 (1:5) 研磨, 反复冻融 3 次后取上清, 提取核酸后, 用建立的 RT-PCR 方法进行检测。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物

提取 NDRV-QY 的 RNA, 经反转录后, 进行 RT-PCR 扩增反应。结果显示: NDRV 扩增的片段长度约 298 bp, 与预期的结果一致 (图 1)。

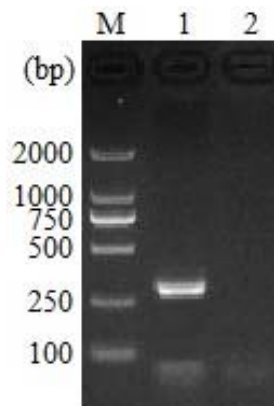


图 1 RT-PCR 反应结果

M: DL 2000 DNA Marker; 1: NDRV 扩增结果; 2: 阴性对照

2.2 反应条件优化结果

2.2.1 引物浓度的确定 采用不同引物浓度进行 RT-PCR 反应。结果显示, NDRV 的最佳引物浓度为 $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ (图 2)。

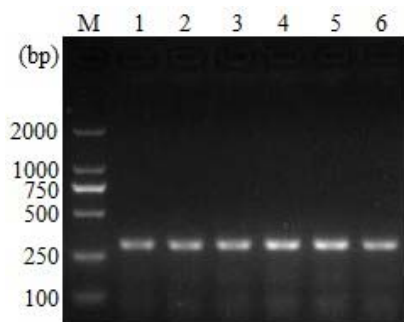


图 2 NDRV 不同引物浓度单一 RT-PCR 反应结果

M: DL 2000 DNA Marker; 1: $4 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 2: $6 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 3: $8 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 4: $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 5: $12 \text{ pmol}/\mu\text{L}$; 6: $14 \text{ pmol}/\mu\text{L}$

2.2.2 退火温度的确定 采用不同退火温度进行 RT-PCR 反应, 结果显示, NDRV 的最佳退火温度为 55°C (图 3)。

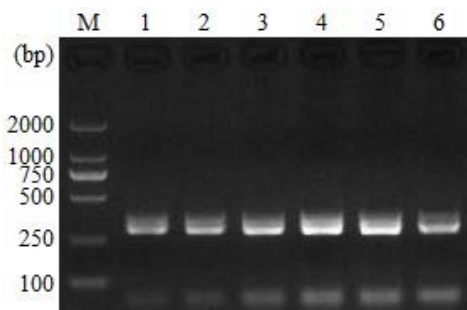


图 3 NDRV 不同退火温度单一 RT-PCR 反应结果

M: DL 2000 DNA Marker; 1: 52°C ; 2: 53°C ; 3: 54°C ; 4: 55°C ; 5: 56°C ; 6: 57°C

2.3 特异性试验

用优化后的方法对不同病毒核酸进行 RT-PCR 反应, 结果显示, NDRV-QY 能扩出 298 bp 大小的片段, 而其他病毒模板没有任何扩增产物 (图 4)。

2.4 敏感性试验

用优化后的方法对 10 倍梯度稀释的 NDRV 进行 RT-PCR 反应, 结果显示, NDRV 的 RT-PCR 方法最低可检测到 10^{-6} 稀释的病毒核酸, 大约 83.4 pg 的病毒 RNA (图 5)。

2.5 临床样品检测结果

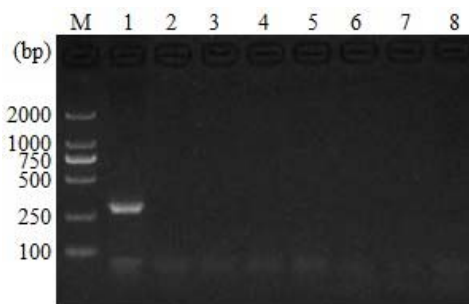


图 4 NDRV 单一 RT-PCR 反应特异性结果

M: DL 2000 DNA Marker; 1: NDRV-QY; 2~7: MDRV-S12、ARV-S1133、DHV、DNDV、AIV、DPV; 8: 阴性对照

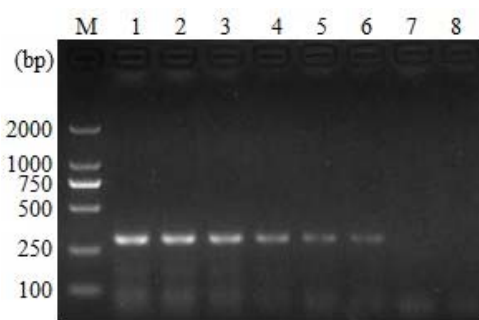


图 5 NDRV 单一 RT-PCR 反应敏感性结果

M: DL 2000 DNA Marker; 1~7: 10^{-1} ~ 10^{-7} ; 8: 阴性对照

应用本研究所建立的 RT-PCR 方法, 对采集的 15 份临床病料进行检测, 其中有 8 份 NDRV 检测阳性, 阳性率为 53.33%。

3 分析与讨论

新型鸭呼肠孤病毒是我国南方地区鸭群呼肠孤病毒中的最新流行株, 临床诊断上可通过病鸭肝脏、脾脏坏死出血的剖解情况进行初步判断, 然而只凭临诊剖检不能确定是否存在混合感染的可能, 必须通过分析分离毒对易感细胞与实验禽类的致病性进行鉴别判断^[6], 但该方法存在费时、费力等缺点。RT-PCR 可从基因水平检测 RNA 病毒的基因, 具有高度敏感性和特异性, 并可大大的缩短 NDRV 的检出时间, 为该病的早期诊断提供敏感、快速、特异、准确的方法。

引物设计是 PCR 检测方法建立的关键。由于禽源呼肠孤病毒属于分节段病毒, 不同种病毒的不同节段核苷酸序列相似性不同, NDRV、MDRV 和 ARV 的 S3 基因具有不同的分子特性^[7-10]。因此, 本研究通过对 GenBank 中登录的 NDRV、MDRV、ARV 等禽源呼肠孤 S3 基因序列进行分析比较, 在 NDRV

S3 基因保守区域设计 1 对特异性引物,建立了针对 NDRV 的 RT-PCR 检测方法,并能从病料以及分离毒尿囊液中扩增出大小约为 298 bp 的目的片段,而在同样条件下的 ARV-S1133、DPV、DHV、DNDV、AIV 均为阴性。

NDRV RT-PCR 的敏感性试验结果表明,在 RT-PCR 反应中,只要引物设计合理,反应条件选择得当,利用 RT-PCR 技术就能检出痕量目的 DNA 片段。由此可见,应用 NDRV RT-PCR 技术可以直接对临床样品进行扩增,而不需对病原进行分离培养,这样就大大提高了对 NDRV 的诊断速度,对 NDRV 和 MDRV 的防控无疑也将有着十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 陈少莺,陈仕龙,林峰强,等.一种新的鸭病(暂名鸭出血性坏死性肝炎)病原学研究初报[J].中国农学通报,2009,25(16):28-31.
- [2] 黄瑜,傅光华,施少华,等.新致病型鸭呼肠孤病毒的分离鉴定[J].中国兽医杂志,2009,12(45):29-31.
- [3] 陈宗艳,朱英奇,王世传,等.一株新型鸭源呼肠孤病毒(TH11株)的分离与鉴定[J].中国动物传染病学报,2012,20(1):10-15.
- [4] 袁远华,王俊峰,吴志新,等.1株番鸭源新型鸭呼肠孤病毒(QY株)生物学鉴定[J].中国兽医学报,2013,33(8):1174-1178.
- [5] 袁远华,吴志新,黄兴国,等.新型鸭呼肠孤病毒病研究进展[J].养禽与禽病防治,2012(10):18-20.
- [6] 陈仕龙,陈少莺,程晓霞.新型鸭呼肠孤病毒分离株的致病性研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(4):14-18.
- [7] 王劭,陈少莺,陈仕龙,等.新型鸭呼肠孤病毒 NP03 株 S3 基因序列分析[J].农业生物技术学报,2010,18(3):567-572.
- [8] Kapczynski D R, Sellers H S, Simmons V, et al. Sequence analysis of the S3 gene from a turkey reovirus[J]. Virus Genes, 2002, 25(1):95-100.
- [9] Le Gall-Reculé G, Cherbonnel M, Arnauld C, et al. Molecular characterization and expression of the S3 gene of Muscovy duck reovirus strain 89026[J]. J Gen Virol, 1999, 80(1):195-203.
- [10] 胡奇林,陈少莺,林峰强,等.番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J].病毒学报,2004,20(3):242-247.

(上接第 23 页)

色,结果为阳性;反之,检测线显红色,结果为阴性。这种检测方法不需要任何仪器设备,操作简单,几分钟时间就能判定结果。胶体金标记快速检测是定性检测,结果主要是作为现场检测的依据。

3.2 酶标免疫分析法

使用试剂盒进行竞争酶标免疫法定量测定尿中的克伦特罗含量。尿样一般不用处理,取 20 μ L 清亮尿样直接进行实验测定(如果尿样浑浊,一定要过滤或离心至清亮)。测定的基础是抗原抗体反应。微孔板包被有针对兔 IgG(Clenbuterol 抗体)的羊抗体。Clenbuterol 抗体被加入,经过孵育及洗涤步骤后,加入 Clenbuterol 酶标记物,标准品及尿样。Clenbuterol 与 Clenbuterol 酶标记物竞争 Clenbuterol 抗体,没有连接的 Clenbuterol 酶标记物在洗涤步骤中被除去。将酶基质(过氧化尿素)和发色剂(四甲基联苯胺)加入到孔中并且孵育。结合的酶标记物将无色的发色剂转化为蓝色的产物。加入反应停止液后使颜色由蓝转变为黄色。在 450 nm 处测量,吸收光强度与样品中的 Clenbuterol 浓度成反比。按光度值计算出结果,这种定量测定的结果,更能反映出尿样中克伦特

罗的残留程度,是判定结果的重要依据。

4 尿样检测结果的处理

4.1 检测合格的猪只,准许屠宰和出栏销售。

4.2 在检测中如发现不合格的:在屠宰检疫中如发现含有“瘦肉精”的猪只,应对该批猪群进行扣押隔离,对该批猪群全部进行“瘦肉精”检测,检测合格的方可准许屠宰,不合格的猪只应作无害化处理。在养殖场中如发现含有“瘦肉精”的猪只,应对场里的商品肉猪全部进行“瘦肉精”检测,并禁止养殖场对外交易。如只是极少部分猪只含有“瘦肉精”的,将不合格的猪只作无害化处理。如情节严重的依法对养殖户进行从重处罚。

5 总结

含“瘦肉精”的肉产品严重威胁着人们的身体健康。如何远离“瘦肉精”呢?首先,群众必须到规范的肉菜市场、超市购买肉类产品,切勿贪小便宜购买来路不明的肉类产品。其次,对于那些不良商家和养殖户,应加大查处力度,发现问题从严处理。最后,畜牧部门应经常不定点不定时地加强对添加“瘦肉精”等违禁药物的监督检查,从源头上保障肉类产品的安全,为市场稳定提供绿色健康的肉产品。

荧光定量 PCR 检测 2 型猪圆环病毒方法的建立

敖艳华, 穆光慧, 郭沈涛, 齐冬梅, 张毓金*

(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 通过克隆 2 型猪圆环病毒(PCV2)的开放阅读框 2 (ORF2) 基因编码其核衣壳蛋白(Cap)的一段靶序列, 构建重组质粒作为标准阳性模板。根据 GenBank 中的靶序列设计一对引物和一条 TaqMan 探针。对 PCR 反应条件优化后, 对构建的标准阳性模板定量, 然后 10× 倍比稀释进行荧光定量 PCR (qPCR) 扩增并制作标准曲线, 初步建立了 PCV2 检测的 qPCR 方法。结果表明, 该方法检测灵敏度可达 1.0×10^2 拷贝/μL, 线性范围为 $10^1 \sim 10^9$, 达 9 个数量级, 并且具有很好的特异性。对起始浓度为 1.0×10^8 、 1.0×10^6 、 1.0×10^4 拷贝/μL 的标准品的最终实际测得 CT 均值分别为 12.77、19.72 和 26.89; 变异系数分别为 0.25%、0.10% 和 0.13%, 均小于 1%, 说明此方法具有良好的准确性和重复性。

关键词: 猪圆环病毒; 荧光定量 PCR; TaqMan 探针

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0028-04

Development of a Real-time PCR Assay for Detection of Porcine Circovirus Type 2

Ao Yanhua, Mu Guanghui, Guo Shentao, Qi Dongmei, Zhang Yujin

(Guangdong Winsun Bio-Pharmaceutical Co., Guangzhou 511356, China)

Abstract: The part of ORF2 sequence of PCV2 was cloned into vector pMD19 -T, and the recombinant plasmid was constructed and used as standard positive control template. According to the published sequence of PCV2 in GenBank, a pair of primers and a TaqMan probe were designed. A real-time PCR assay using quantitative concentrations of serial 10 fold dilutions of recombinant plasmid DNA as standards was developed by optimizing circulation parameters. A standard curve was achieved and the result showed that the sensitivity of this method was 1.0×10^2 copies/μL and the linear range was $10^1 \sim 10^9$. Ct values of initial concentrations of 1.0×10^8 , 1.0×10^6 and 1.0×10^4 copies/μL were 12.77, 19.72 and 26.89; And the variation coefficients were 0.25%, 0.10% and 0.13% respectively, all below 5%. Taken together, our results suggest that this method is highly specific, sensitive and repeatable.

Key words: Porcine circovirus; real-time PCR; TaqMan probe

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 属于圆环病毒科 (Circoviridae) 圆环病毒属, 是迄今为止发现的最小的病毒, 其粒子直径最小, 仅 17 nm, DNA 基因组长 1.7 kb, 目前只发现其有一个分子量为 30 kD 的蛋白质^[1]。病毒粒子为二十面体对称、无囊膜、单股环状 DNA 病毒^[2]。

现已知 PCV 有两个血清型, 即 PCV1 和 PCV2。PCV1 为非致病性的病毒; PCV2 为致病性的病毒, 它是引起断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Post-

weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) 的主要病原^[3]。其他协同因素如与猪瘟病毒 (CSFV) 或者猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 等混合感染可增强该疾病的严重程度。PCV2 及其相关的猪病, 可造成 10%~30% 不等的死亡率, 较严重的猪场在暴发本病时死淘率高达 40%, 因而给养猪业造成严重的经济损失。现已被世界各国的兽医与养猪业者认为是继猪繁殖与呼吸综合征之后另一个危害极其严重的猪病。

收稿日期: 2013-11-27

*: 通讯作者

目前,对于 PCV2 的检测和鉴定方法有 ELISA^[4]、IFA^[5]、PCR^[6]和 ISH^[7]等多种方法。荧光定量 PCR 技术不但具有灵敏度高、检测速度快、特异性强等优点。它不仅可以用于 PCV2 的早期诊断,而且可以准确地计算出组织中病毒的含量,因而可用于实验室中 PCV2 的培养条件的摸索、致病机理以及相关的分子生物学研究。本研究建立了针对 PCV2 的 Taq Man 实时荧光定量 PCR 检测方法,对疾病的早期监测显示出较好的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与材料

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,普通 PCR 仪,凝胶成像分析系统,高速离心机,紫外分光光度计。QIAGEN 的 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、Premix Ex Taq (Probe qPCR) 等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 病毒、质粒和菌种

PCV2 由广东永顺生物制药股份有限公司分离并保存;pMD19-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;宿主菌 TOP10 为华南农业大学传染病实验室任涛教授惠赠。

1.3 标准阳性模板的制备

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中公布的序列,设计特异性引物扩增 PCV2 ORF2 的部分片段:上游引物 PCV2-F:5'-GTATTCCTGGTCGTAT-3';下游引物 PCV2-R:5'-TCGTTTCAGATATG-3',扩增片段为 648 bp,扩增区域为 1052~1699 nt。引物由 Invitrogen 公司(上海)合成。

1.3.2 标准品的构建 用上述引物进行常规 PCR 反应扩增 PCV2 阳性模板 DNA。PCR 反应条件为 94℃ 5min,94℃ 40s,53℃ 30s,72℃ 40s,进行 30 个循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物回收纯化后克隆于 pMD19-T 载体中,构建重组质粒;将重组质粒转化入 TOP10 感受态细胞内;PCR 筛选阳性克隆菌进行测序,从测序正确的菌液中提取重组质粒,线性化后浓度用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ nm,根据阿弗加德罗常数将浓度转换为拷贝数。重组质粒 -20℃ 保存,用前稀释。

1.3.3 标准品的制备 将线性化的质粒稀释至 1.0×10⁹ 拷贝/μL,-20℃ 保存备用。按 10× 倍比稀释分别稀释成 10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、

10⁸、10⁹ 拷贝数/μL 的 9 个浓度,作为阳性定量标准模板,用于荧光定量 PCR 反应条件的优化、敏感性的研究和标准曲线的建立及样品的检测。

1.4 荧光定量 PCR 方法的建立

1.4.1 引物与 TaqMan 探针的设计与合成 根据 PCV2 制备标准品所涉及到的片段(1052~1699 nt)的序列及 GenBank 中公布的序列设计一对特异引物和 TaqMan 探针,由宝生物工程(大连)有限公司标记与合成,引物和探针序列为:PCV2-qF:5'-GGAAGTAATCAATATGTGAT-3' PCV2-qR:5'-ACGGCTATGTAACTACTC-3',PCV2-qP:5'-(FAM)TGCATATGACAGCCCTAGTAT(Eclipse)-3'。

1.4.2 引物和探针浓度的筛选 应用含目的片段的质粒作为检测样品,将引物和探针的浓度配成 2、5、10、15、20、30 μmol/L,采用矩阵法优选引物和探针的最佳浓度。

1.4.3 荧光定量 PCR 扩增反应总体积为 25 μL,其中 Premix Ex Taq 12.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,探针 0.5 μL,ROX Reference Dye II (50×)0.4 μL,模板 2.0 μL,余下用灭菌蒸馏水补足。置 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应,反应条件为 95℃ 5min,95℃ 15s,55℃ 40s,进行 40 个循环;在每个循环的退火结束时收集荧光信号。PCR 结束后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.4 qPCR 的敏感性与标准曲线的建立 以含 1.0×10⁹~1.0×10¹ 拷贝/μL 的标准品为模板进行 qPCR,以起始模板数的对数为 X 轴,CT 值为 Y 轴作回归曲线,建立 PCV2 检测的标准曲线。

1.4.5 qPCR 的特异性、重复性和稳定性 对 PRV、PPV、PCV、CSFV 细胞培养物以及 PK-15 细胞和注射用水检测本方法的特异性;分别重复 3 次检测模板 DNA 含量为 1.0×10⁴、1.0×10⁶、1.0×10⁸ 拷贝/μL 的样品,评价本方法的重复性和稳定性。

2 结果

2.1 PCR 扩增

取 PCR 产物 5 μL 于 3% 琼脂糖凝胶电泳。结果表明标准品扩增产物约为 648 bp 的 DNA 片段,qPCR 扩增产物约为 108 bp 的 DNA 片段,与预计大小相一致(如图 1 和 2)。

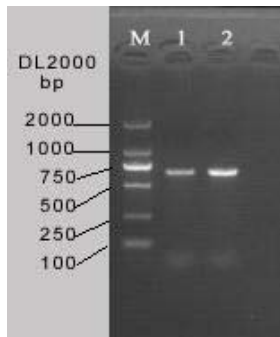


图 1 PCV2 标准品 PCR 扩增结果

M: DL2000; 1-2: 阳性样品

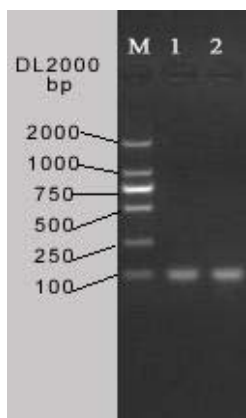


图 2 qPCR 扩增产物电泳结果

M: DL2000; 1-2: 阳性样品

2.2 标准品扩增片段基因克隆及鉴定

PCR 产物经纯化后,与 pMD19-T 载体连接构建重组质粒。PCR 鉴定阳性的菌液可扩增到约 648 bp 的片段,与连接前的 PCR 产物大小一致。重组的质粒进行序列测定表明,测序结果与目的片段序列完全一致。

2.3 qPCR 反应条件的优化

采用矩阵法对 PCR 的引物和探针使用浓度进行摸索选出最佳浓度。通过多个批次的重复试验,结果表明,引物加入量为 $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol/L}$)、探针加入量为 $0.5 \mu\text{L}$ ($10 \mu\text{mol/L}$) 时,本底反应最小,可获得较小的值且扩增效率最高,阴性对照重复 3 次均未扩增,阳性样品出现典型的扩增曲线 ($8 < \text{CT} < 35$)。

2.4 标准曲线的建立

利用已经优化好的反应条件,用 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝 / μL 的标准品进行扩增,获得动

力学曲线(见图 3),计算 C_T 值绘制标准曲线(见图 4)。

2.5 qPCR 敏感性

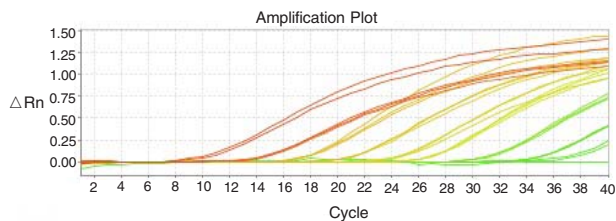


图 3 荧光定量 PCR 动力学曲线

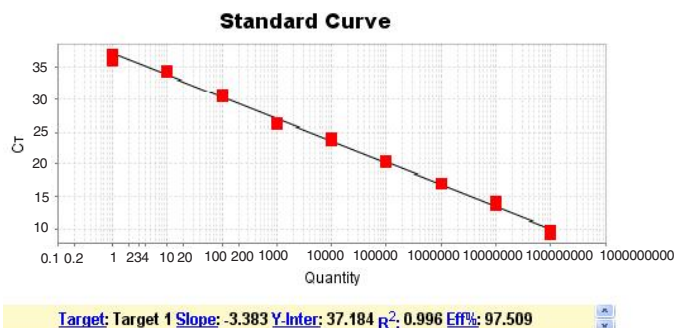


图 4 荧光定量 PCR 标准曲线

用 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^6$ 拷贝 / μL 的标准品进行扩增, $\text{CT} < 35$ 即可判为阳性。6 组样品均可有效扩增, 1.0×10^3 拷贝 / μL 的样品的 C_T 值为 34, 为阳性, 1.0×10^1 拷贝 / μL 的样品的 C_T 值达到 36, 判为无效扩增即阴性。结果表明,本研究建立的 qPCR 能检出最低浓度为 10^2 拷贝 / μL 模板。见图 5。

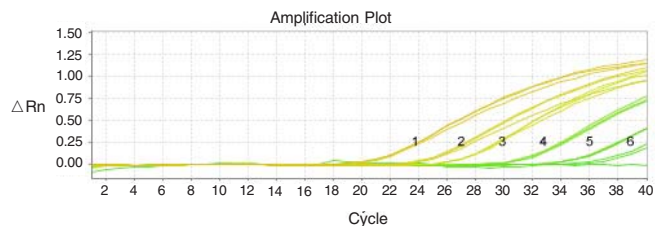


图 5 荧光定量 PCR 敏感性试验结果

1: 1.0×10^6 2: 1.0×10^5 3: 1.0×10^4 4: 1.0×10^3
5: 1.0×10^2 6: 1.0×10^1

2.6 qPCR 的特异性

对 PRV、PPV、PCV1、PCV2、CSFV 细胞培养物以及 PK-15 细胞和注射用水检测本方法的特异性,每个样品重复 3 次,其中只有 PCV2 为阳性扩增,其他的各样品均未扩增,表明该方法具有较高的特异性,见图 6。

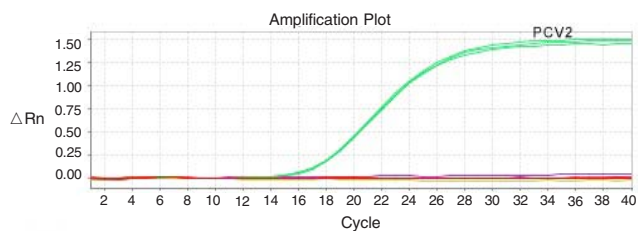


图 6 荧光定量 PCR 特异性试验结果

2.7 qPCR 的重复性和稳定性

分别选取 10^4 、 10^6 、 10^8 拷贝 / μL 的标准品, 利用已建立好的反应条件进行 qPCR, 每个样品做 3 个平行的反应管。结果表明, 重复性检测组间的变异系数分别为 0.25%、0.10% 和 0.13%, 均小于 5%, 表明平均值误差非常小, 扩增效率稳定 (见表 1)。该结果说明本试验建立的 qPCR 方法具有良好的重复性和稳定性。

表 1 qPCR 的重复性和稳定性试验结果

拷贝数 (μL)	C _T 值			平均值	变异系数 CV (%)
	1	2	3		
10^8	12.75	12.81	12.76	12.77	0.25
10^6	19.70	19.74	19.72	19.72	0.10
10^4	26.85	26.91	26.91	26.89	0.13

3 讨论

断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) 是近年来新出现的一种猪病毒性传染病, 该病对养猪业的危害性和严重性日益受到关注。现已确定, PCV2 感染是导致 PMWS 的重要条件。虽然 PCV2 单独感染可引发 PMWS, 但是感染的 PCV2 病毒只有达到一定数量时, 才能出现临床症状^[8], 因此, 对猪体内 PCV2 的早期诊断和抗原的定量能对疾病防治起很好的预警作用。另外, PCV2 和其他病毒如 PRRSV、PRV 等混合感染时, 其他病毒感染的典型临床症状可能掩盖了 PCV2 的存在, 那么, 对 PCV2 诊断方法的灵敏性的要求就更高。

ELISA、IFA 等传统的诊断方法都存在不能定量、定量不准确或者主观性强等缺点, 在传统的

PCR 技术的基础上, 荧光定量 PCR 检测技术逐渐发展起来, 很好的解决了这个问题。实时荧光定量 PCR 检测技术具有高灵敏度、快速、简便、高效等特点, 已广泛用于各类病原的检测, 当然, 由于用到的试剂尤其是引物和探针的合成使其成本较高, 以及对仪器和实验室的要求较高从而使得该方法不能得到普及。

本方法建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法可以对 PCV2 的 DNA 靶序列模板进行准确、特异、敏感的定量分析。采用矩阵法优选引物和探针的浓度, 并经过反应条件的优化, 建立了 PCV2 的快速定量检测方法。该方法敏感性可达 1.0×10^2 拷贝 / μL , 并具有良好的特异性和重复性。整个检测可在收到样品之后 2 小时内完成, 是检测猪 PCV2 比较敏感和可行的方法, 该方法有望将成为 PCV2 监测和诊断的强有力工具。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 科学出版社, 1997:1175.
- [2] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papova-virus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines[J]. Zentralbl, Bckteriol, 1974, 226, 153-167.
- [3] Stevenson G W, Kiupe I M, Mittal S K, et al. Ultra structure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells[J]. Vetpathology, 1999, 36:368-378.
- [4] 郎洪武, 王力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及猪断奶多系统衰弱综合征的诊断[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(3):3-5.
- [5] 周继勇, 陈庆新, 叶菊秀, 等. 猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1):1-3.
- [6] 芦银华, 陈德胜, 戴亚斌, 等. 用复合 PCR 检测猪圆环病毒[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(9):8-9.
- [7] 刘方娜, 刁有祥, 王妮, 等. 猪圆环病毒 2 型地高辛标记探针检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(7):771-774.
- [8] Inger Marit Brunborg, Torfinn Moldal, Christine Monceyron Jonassen. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemicwasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR[J]. J Virol Meth, 2004, 122:171-178.

卵丘细胞对卵母细胞成熟、受精和胚胎发育的影响试验

石俊松¹, 罗绿花¹, 周荣¹, 麦然标¹, 周秀¹, 余婉娴¹, 李紫聪², 吴珍芳^{2*}

(1. 广东省温氏食品集团股份有限公司研究院, 广东 新兴 527439; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 将从猪卵巢上获取的卵母细胞根据卵丘细胞层数的多少分为两类, 并将这两类卵母细胞进行成熟培养、体外受精和孤雌激活, 以验证两类卵母细胞的发育潜能。结果显示, 将两类卵母细胞分别进行成熟培养时, 优级卵的成熟率高于次级卵 ($67.42 \pm 1.52\%$ vs $48.33 \pm 2.85\%$), 且差异极显著 ($P < 0.01$); 将成熟的卵母细胞进行孤雌激活后, 优级卵的囊胚率高于次级卵 ($58.00 \pm 2.88\%$ vs $41.00 \pm 6.40\%$), 且差异极显著 ($P < 0.01$), 但囊胚总细胞数两者无显著差异 ($P > 0.05$); 将成熟的卵母细胞进行体外受精后, 优级卵的囊胚率、囊胚总细胞数均高于次级卵 ($18.00 \pm 5.70\%$ vs $4.25 \pm 2.31\%$, 41.7 ± 3.33 vs 36.2 ± 2.10), 且差异极显著 ($P < 0.01$); 进行受精卵孵育时, 未去除卵丘细胞的胚胎卵裂率、囊胚率、囊胚总细胞数均高于去除卵丘细胞的 ($88.14 \pm 7.48\%$ vs $58.69 \pm 2.89\%$, $51.2 \pm 7.33\%$ vs $11.92 \pm 2.29\%$, 41.7 ± 3.33 vs 36.8 ± 3.15), 且差异极显著 ($P < 0.01$)。以上结果说明: 卵丘细胞层数较多的卵母细胞成熟率高, 且其孤雌和体外受精胚胎的发育潜能也好; 卵丘细胞存在时, 有助于卵母细胞的受精及以后的胚胎发育。

关键词: 猪; 卵丘细胞; 胚胎发育; 影响

中图分类号: S814.8

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0032-04

Effects of Cumulus Cells on in Vitro Maturation, Fertilization and Embryo Development of Procine Oocytes

Shi Junsong¹, Luo Lvhua¹, Zhou Rong¹, Mai Ranbiao¹, Zhou Xiu¹, Yu Wanxian¹, Li Zicong², Wu Zhenfang^{2*}

(1. Guangdong WENS Foodstuff Group Limited Company Research Institute, Xinxing 527400, China; 2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, porcine oocytes collected from ovaries were divided into two groups according to the thickness of their cumulus cell layer. Group 1 of oocytes have 3 or more than 3 layers of cumulus cells, Group 2 of oocytes have 1-2 layers. These two groups of oocytes were used for maturation culture, in vitro fertilization (IVF) and partheno-genetical activation (PA) tests to compare their developmental potential. The results showed that oocytes of Group 1 had significantly higher ($P < 0.01$) maturation rate than that of Group 2 ($67.42 \pm 1.52\%$ vs $48.33 \pm 2.85\%$), and PA embryos generated from Group 1 oocytes had significantly higher ($P < 0.01$) blastocyst rate than that of PA embryos produced from Group 2 ($58.00 \pm 2.88\%$ vs $41.00 \pm 6.40\%$) although the blastocyst total cell number was similar ($P > 0.05$) between the two groups. The blastocyst rate ($18.00 \pm 5.70\%$ vs $4.25 \pm 2.31\%$) and the blastocyst total cell number (41.7 ± 3.33 vs 36.2 ± 2.10) of IVF embryos generated from Group 1 oocytes were significantly higher ($P < 0.01$) than that of Group 2. Moreover, IVF embryos generated from cumulus cells-enclosed oocytes have a higher ($P < 0.01$) cleavage rate ($88.14 \pm 7.48\%$ vs $58.69 \pm 2.89\%$), a higher ($P < 0.01$) blastocyst rate ($51.2 \pm 7.33\%$ vs $11.92 \pm 2.29\%$) and higher ($P < 0.01$) blastocyst total cell number (41.7 ± 3.33 vs 36.8 ± 3.15), compared to IVF embryos produced from cumulus-denuded oocytes. These results suggest that oocytes having thicker layer of cumulus cells bear higher maturation rate and higher embryo developmental ability after IVF and PA, and the presence of cumulus cells during oocyte fertilization was helpful to promote the developmental potential of IVF embryos.

Key words: Porcine; Cumulus Cells; Embryo Development; Influence

收稿日期: 2013-11-20

*: 通讯作者

基金项目: 国家科技重大专项 (2013ZX08006)

随着生物工程相关技术的日渐成熟,利用卵母细胞体外成熟、体外受精、克隆胚胎以及胚胎体外培养技术进行工厂化生产胚胎,是胚胎工程技术商业化的发展趋势。利用该项技术已经得到许多动物的“试管后代”和克隆后代,此外奶牛体外受精和胚胎培养已进行商品化应用^[1]。但是因体外成熟的卵母细胞质量难以保证,从而影响了卵母细胞体外受精胚胎、克隆胚胎和胚胎发育的效率,最终限制了相关技术在生产中的应用与推广。为了提高卵母细胞的利用率,科研人员在对卵母细胞体外成熟培养液、培养温度、培养气体等体系改进的过程中,也逐步认识到卵丘细胞对卵母细胞生长、发育、成熟、受精、胚胎发育等起着显著的作用^[2]。但体外获取的卵母细胞其周围包裹的卵丘细胞数量不一,传统上将胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complex, COCs)按卵丘细胞层数分为三类:A类周围有5层以上卵丘细胞包被;B类周围有5层以下,1层以上卵丘细胞包被;C类仅有单层卵丘细胞或无卵丘细胞包被^[3]。在卵母细胞培养中,一般C类COCs弃之不用,而B类一直未有定论。而在实际操作中,一般将COCs分为两类,胞质均匀且包被3层以上的定义为优级卵,3层以下1层以上的定义为次级卵。本研究就此探讨卵丘细胞对卵母细胞成熟、受精和胚胎发育的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

猪卵巢来自新兴屠宰场;精液采自广东温氏

集团水台原种猪场的一级纯种公猪,精液经稀释后在1 h内送到实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 猪卵母细胞的收集及体外成熟培养 屠宰母猪获取卵巢,放入加有50 μg/mL的青霉素和链霉素的37℃左右的生理盐水内,5 h内运回实验室。然后用加有50 μg/mL的青霉素和链霉素的生理盐水冲洗3遍,用配有18G针头的10 mL注射器抽取2~6 mm的卵泡,在体视显微镜下用自制捡卵针捡取COCs。用洗卵液洗3遍后,再用成熟培养液洗2遍,然后放入已在CO₂培养箱内平衡4 h以上的成熟培养液中。在39℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中成熟培养44 h。将成熟培养后的COCs与0.1%透明质酸酶混合,用移液枪反复吹打除去卵丘细胞。去除卵丘细胞后,挑选周隙明显且无杂质、胞质均匀、明显排出第一极体的卵母细胞进行孤雌激活(PA)、体外受精(IVF)试验。记录优级卵、次级卵在卵母细胞成熟和胚胎发育上的不同。

1.2.2 猪孤雌胚胎的激活和体外受精胚胎的生产 猪孤雌胚胎的生产参照文献^[4]的方法,体外受精胚胎的生产参照文献^[5]的方法。

1.2.3 胚胎的体外培养及发育评价 将体外受精和孤雌胚胎激活当天记为第0 d,第2 d检查卵裂情况。第6 d检查囊胚发育情况,分别计算分裂率和囊胚率,并对囊胚进行H33342染色计数(包括总细胞数),有囊胚腔且总细胞数在20以上的视为囊胚。

1.3 统计分析

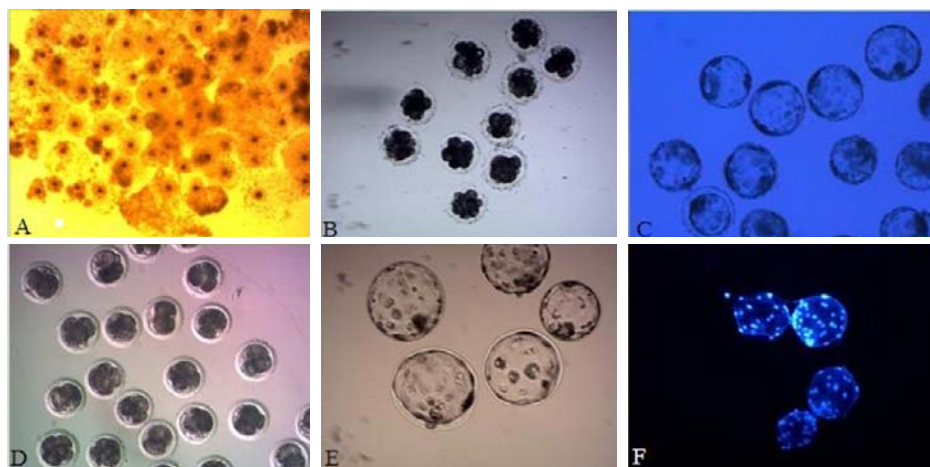


图 A: 卵母细胞成熟培养

图 B: 体外受精胚胎

图 C: 体外受精囊胚

图 D: 孤雌胚胎

图 E: 孤雌囊胚

图 F: 囊胚荧光染色

数据结果用平均数±SE表示。胚胎卵裂及囊胚发育的百分率用SPSS的卡方方法进行分析,囊胚细胞数用单因素方差(ANOVA)进行分析。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 时差异极显著。

2 结果与分析

2.1 卵丘细胞层数对卵母细胞成熟的影响

试验结果见表1。优级卵的成熟率高于次级卵的,且差异极显著($P<0.01$)。试验结果表明,卵丘细胞层数越多,越有利于卵母细胞的发育成熟。

表1 卵丘细胞对卵母细胞成熟率的影响

项目	培养卵母细胞数	MII卵母细胞数(成熟率%)
优级卵	1957	1266(67.42±1.52) ^a
次级卵	1152	526(48.33±2.85) ^b

注:同一列相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

2.2 优级卵和次级卵对孤雌胚胎发育的影响

试验结果见表2。优级卵和次级卵PA胚胎卵裂率和囊胚总细胞数差异不显著,但优级卵囊胚率极显著地高于次级卵($P<0.01$)。试验结果表明,卵母细胞质量的优劣影响孤雌胚胎的发育,有较多卵丘细胞包裹的卵母细胞的发育能力高于有较少卵丘细胞包裹的卵母细胞。

2.3 优级卵和次级卵对IVF胚胎发育的影响

表4 卵丘细胞存在与否对受精的影响

项目	MII卵母细胞数(个)	卵裂数(卵裂率%)	囊胚数(囊胚率%)	总细胞数
未去卵丘细胞受精	143	134(88.14±7.48) ^a	32(21.41±1.81) ^a	51.2±7.33 ^a
去除卵丘细胞受精	142	83(58.69±2.89) ^b	16(11.92±2.29) ^b	36.8±3.15 ^b

胞的受精及以后的胚胎发育。

3 结论与讨论

3.1 由实验结果来看,优级卵的卵母细胞成熟率显著高于次级卵的,且对这些卵母细胞进行孤雌激活和体外受精后,优级卵母细胞其PA胚胎和IVF胚胎的囊胚率也显著高于次级卵的,由此说明包裹卵丘细胞层数较多的卵母细胞,其成熟及后期的发育均优于包裹层数较少的。一般认为,卵丘细胞对卵母细胞的体外成熟是有益的^[6],从机理上讲,卵母细胞内蛋白质的磷酸化与去磷酸化、氨基酸的摄入等都受到卵丘细胞的调节,且

表2 卵丘细胞对孤雌胚胎发育潜能的影响

项目	MII卵母细胞数(个)	卵裂数(卵裂率%)	囊胚数(囊胚率%)	总细胞数
优级卵	353	323(91.17±0.75) ^a	199(58.00±2.88) ^a	46.4±4.65 ^a
次级卵	690	623(91.33±1.23) ^a	264(41.00±6.40) ^b	42.8±2.67 ^a

试验结果见表3。优级卵和次级卵IVF胚胎卵裂率差异不显著,但优级卵的囊胚率和囊胚总细胞数高于次级卵的,且差异极显著($P<0.01$)。试验结果表明,卵母细胞质量的优劣影响IVF胚胎的发育,有较多卵丘细胞包裹的卵母细胞的发育能力高于有较少卵丘细胞包裹的卵母细胞。

表3 卵丘细胞对IVF胚胎发育潜能的影响

项目	MII卵母细胞数(个)	卵裂数(卵裂率%)	囊胚数(囊胚率%)	总细胞数
优级卵	608	541(87.75±3.75) ^a	102(18.00±5.70) ^a	41.7±3.33 ^a
次级卵	465	405(85.50±6.04) ^a	20(4.25±2.31) ^b	36.2±2.10 ^b

2.4 卵丘细胞存在与否对受精的影响

将优级卵进行IVF试验,但进行精卵孵育时分为两类,另一类未去除卵丘细胞进行精卵孵育,一类去除卵丘细胞。实验结果见表4,卵裂率、囊胚率和囊胚总细胞数中,未去除卵丘细胞的均高于去除的,且差异极显著($P<0.01$)。实验结果表明,未去除卵丘细胞进行精卵孵育,有助于卵母细

cAMP、IP₃、Ca²⁺等第二信使也是通过缝隙连接从卵丘细胞进入卵母细胞的^[7],从而对卵母细胞的生长和成熟起着重要的调控作用。Wongsrikeao^[8]研究也证实,体外成熟去除卵丘细胞的卵母细胞,受精后的卵裂率和原核形成率下降,说明卵丘细胞与卵母细胞的体外成熟及其胚胎的发育有关。

3.2 将未去除卵丘细胞的卵母细胞和去除卵丘细胞的卵母细胞进行精卵孵育6h后进行胚胎培养发现,未去除卵丘细胞的卵母细胞的囊胚率显著高于去除卵丘细胞的。这与Hamano^[9]的结果相

同,Hamano 对不同卵丘细胞层的卵母细胞进行了 IVF 试验,发现卵丘细胞层在 6 层以上的卵母细胞其受精后囊胚发生率为 29.80%,3-5 层的为 19.50%,而 1-2 层的只有 3.20%。Cox 等^[10]研究认为只有与透明带紧密结合的 COCs 才对体外受精具有促进作用,而 Fatechi 等^[11]研究认为松散的卵丘细胞的存在同样对体外受精具有促进作用。但不管紧密或者松散,研究结果显示卵丘细胞的存在具有促进受精的作用,而笔者在进行猪活体冲胚实验中也发现,已进入输卵管内的卵母细胞周围仍存在大量的卵丘细胞,因此进行精卵孵育时,最好保留卵丘细胞。

参考文献:

[1] Alberto M. Luciano, Silcia Modina, Rita Vassena, et al. Role of intracellular cyclic adenine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communication on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte[J]. Biology of reproduction, 2004, 70:465-472.
 [2] Sutton M L, Gilchrist R B, Thompson J G. Effects of in vivo and in vitro environment on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity[J]. Human reproduction update, 2003, 9(1):35-48.
 [3] 王海,曾申明,朱士恩. 培养介质、卵丘细胞和卵泡直径对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2002. 38 (5):

15-17.
 [4] 石俊松,罗绿花,周荣,等. 不同电激活参数及 CB 处理对猪卵母细胞孤雌发育的影响[J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(3): 388-392.
 [5] 石俊松,赵云翔,罗绿花,等. 卵巢生理状态、精子获能时间及精卵共孵育时间对猪体外受精及胚胎发育的影响[J]. 黑龙江动物繁殖, 2011, 19(1):15-18.
 [6] Byskov A G, Andersen C Y, Hossaini, et al. Cumulus cells of oocyte cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 46(3):296-305.
 [7] 陈大元. 受精生物学—受精机制与生殖工程[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
 [8] Wongsrikeao P, Kaneshige Y, Ookir, et al. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation fertilization and development of porcine oocytes[J]. Reprod DomAnim, 2005, 40(2):166-170.
 [9] Hamano S, Kuwayama M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method[J]. Theriogenology, 1993, 39:703-712.
 [10] Cox J F. Effect of cumulus cells on in vitro fertilization of in vitro matured cow and sheep oocytes (abstract) [J]. Theriogenology, 1991, 35:191
 [11] Fatechi A N, Zeinstva E C, Koosij R V, et al. Effect of cumulus cell removal in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate[J]. Theriogenology, 2002, 57:1347-1355.



·行业信息·

农业部:决不再发生黄浦江死猪类似事件

农业部新闻办公室 1 月 15 日下午举行新闻发布会,向媒体介绍农产品质量安全监管有关情况。农业部副部长陈晓华在回答记者提问时表示,去年黄浦江漂死猪的事件,影响很大,农业部现在已经对各地出了要求,要采取一定措施,死防死守,决不能再发生类似的事件。

陈晓华指出,去年黄浦江发生了这样的事件,农业部以及农业系统都举一反三,采取措施解决好这一事件。已经在着手研究建立病死动物的无害化处理的长效机制,已经制定了病死动物的无害化技术处理规范来指导各地开展这项工作。特别是去年 9 月,在 19 个省 212 个县,主要是在大城市周边、重点养殖区、沿江附近的重点养殖县开展无害化处理的试点。因为这件事情是一个非常复杂的系统工程,要通过试点来摸索办理、建立机制。

下一步农业部一方面要深入推进试点的进程,从实践中找到一套行之有效的约束和激励机制,来保障无害化的处理,能够有序地进行。另一方面,要强化督促检查,特别是要和公安、环保、水务等方面建立相应的联动机制,严厉查处随意丢弃病死动物的违法行为。这件事关系到产业,特别是疫病防控,关系到畜产品的安全,也关系到环境的保护。所以要把它作为一个重要的工作来部署和积极推进。(信息来源:人民网)

大豆卵磷脂在犬粮中的应用前景

何小军, 左建军, 钟子穗, 刘清神*

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 大豆卵磷脂 (soybean lecithin) 具有改善机体神经功能障碍及紊乱、恢复脑功能、增强记忆力、延缓衰老、防止动脉粥样硬化和防治糖尿病等功效。但目前的应用主要集中在畜禽营养学方面, 并且作用机理尚不十分明确。本文主要综述了大豆卵磷脂的功能以及在犬粮中的应用前景。在生产商品犬粮过程中, 可以将大豆卵磷脂作为功能性营养因子添加到犬粮中, 以期改善犬的记忆和学习能力、提高免疫力和延长寿命等。由于大豆卵磷脂吸湿性强且不耐高温, 可以考虑作为饲料预混剂或制作微胶囊饲料时添加, 经过稳定化处理, 保证其活性。

关键词: 大豆卵磷脂; 犬粮; 应用

中图分类号: S816.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0036-05

Applications of Soybean Lecithin in Dog Feeds

He Xiaojun, Zuo Jianjun, Zhong Zi sui, Liu Qingshen*

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Soybean lecithin has such functions as anti body's nerve dysfunction and disorder, restoring brain function, enhancing memory ability, delaying senility, preventing atherosclerosis and diabetes, and so on. But it is mainly used in poultry nutrition, and the function mechanism is not very clear. This paper reviews the functions of soybean lecithin and its applications in dog foods. Soybean lecithin can be added into dog foods as functional nutrition factor, so as to improve dog's memory and learning ability, enhance its immunity and prolong lifespan. The moisture absorption of soybean lecithin is strong, and it can not endure high temperature. So, in order to ensure its activity, soybean lecithin can be used as feed premix or added into microencapsulated feed after stabilization treatment.

Key words: Soybean lecithin; dog feeds; applications

经过数年的发展, 国内的犬粮虽然在市场上占有一席之地, 但是与国外产品相比, 整体竞争力依旧不强。国外品牌在中国市场上基本处于垄断地位, 出现了国内市场国外宠物主食一统天下, 而国内知名品牌少之又少的现状。主要原因是国有产品在犬的诱食、消化、增进毛发光泽、保持体型等诸多方面远不能与国外产品相比。随着人们对犬健康的关注越来越多, 犬粮已经不能仅仅认为是营养和能量的来源, 作为饮食成分, 这些食物的特性和功能必须被考虑。犬的主人对保持犬体健康和活力、提高犬的免疫和记忆力、学习能力以及尽可能长的寿命较为关注。因此为提升我国犬粮

的竞争力, 应大力研发兼具营养和保健等多种功能的产品。大豆卵磷脂在改善机体神经功能障碍及紊乱、恢复脑功能、增强记忆力、延缓衰老、防止动脉粥样硬化和防治糖尿病等方面有一定的功效, 已经应用到畜禽饲料中, 并取得了一定的成效。但在犬粮中的应用尚未见报道。

1 大豆卵磷脂

1.1 大豆卵磷脂的组成和结构

大豆卵磷脂 (soybean lecithin, 又称大豆蛋黄素), 是精制大豆油过程中的副产品。主要是由磷脂酰胆碱 (PC) (卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰肌醇 (PI) 以及大豆油组成^[1]。天然卵磷脂是

收稿日期: 2013-12-24

*: 通讯作者

含有不同脂肪酸的几种卵磷脂的混合物。在卵磷脂分子的脂肪酸中,常见的有软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻三烯酸和花生四烯酸等^[2]。其化学结构主要由三甘油酯分子上的磷酸与胆碱等基团(X)结合而成。结构式如图1^[3]:

式中R1和R2是代表脂肪酸的烃基,其R1和R2中的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸是混合配位的。大豆卵磷脂主要成分含量:19%~20%的卵磷脂(磷脂酰胆碱)、8%~20%脑磷脂(磷脂酰乙醇胺)、20%~21%的磷脂酰肌醇及磷脂酰丝氨酸等^[3]。

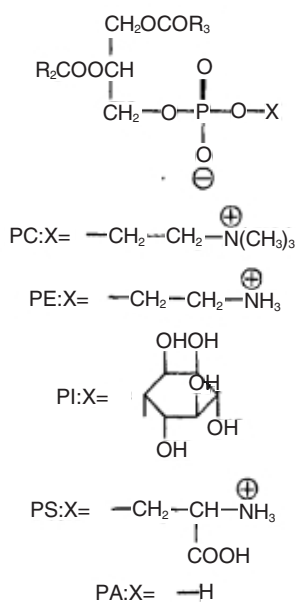


图1 大豆卵磷脂的结构式

1.2 大豆卵磷脂理化性质

大豆卵磷脂同时具有亲水性磷酸脂酰基、胆碱或胆胺等(极性基团)和疏水性脂肪酸基(非极性基团)。因此卵磷脂是一种两性表面活性剂,能形成水包油型乳剂。其等电点为pH=6.7。纯净的卵磷脂(液态)为淡黄色,有清淡柔和的香味,可溶于乙醇、甲醇、氯仿等有机溶剂中,也能溶于水成为胶体状态,但不溶于丙酮,且不同的磷脂在有机溶剂中溶解度不同,故可用有机溶剂来提取分离卵磷脂^[4]。研究表明卵磷脂具有多种理化功能:乳化功能、离型作用、溶解作用、润湿作用、发泡作用、晶化控制功能、防止淀粉老化作用等^[5]。

2 大豆卵磷脂的生理功能

2.1 参与细胞膜组成

卵磷脂是动物细胞生物膜脂双层结构的重要组成部分,保证膜的完整性和通透性,增加膜流动性和膜酶活性^[6]。

2.2 提供胆碱、必需脂肪酸等机体必需的营养物质

卵磷脂中主要成分PC含有有机胆碱成分,经代谢可释放胆碱^[7];可将胆碱有控制地释放进动物体内,使血液胆碱水平保持长期稳定,这有助于动物在耐力运动中保持体力;有利于胎、婴儿神经的发育;可消除青春痘、雀斑并滋润皮肤;可预防老年痴呆的发生;能有效地化解胆结石;是良好的心理调和剂。

2.3 延缓机体衰老

随着年龄的增加,机体清除自由基的能力下降,过多自由基与游离或结合状态的不饱和脂肪酸作用,产生脂褐质,即老年斑^[8,9]。而卵磷脂具有抗油脂氧化作用,修复损伤的生物膜,维持皮肤角质层水分含量的稳定和抑制角质细胞脂褐质的形成,延缓机体衰老^[10,11]。

2.4 调节脂类代谢,预防疾病

大豆卵磷脂可以通过阻止胆固醇在心脑血管壁和肝脏的沉积^[12]、除去肝内脂肪的沉积^[13]、参与高密度脂蛋白的合成^[14]、促进脂肪、胆固醇的代谢和排放^[15,16]等途径调节脂肪代谢和预防脂肪肝、动脉粥样硬化等疾病^[7]。

2.5 促进神经传导,提高大脑活力

食物中的卵磷脂被机体消化吸收后释放出胆碱,并随血液循环系统送至大脑。在胆碱乙酰转移酶作用下与乙酰COA反应生成乙酰胆碱,乙酰胆碱含量增加可促进大脑神经突触迅速发达,从而使大脑中神经细胞间信息传递速度加快,提高记忆力和学习能力^[17]。

3 大豆卵磷脂的应用

3.1 食品工业

在食品工业中,大豆卵磷脂普遍作为乳化剂、抗氧化剂、发泡剂、催长剂等广泛应用于糖果、巧克力、饼干、肉类制品、速溶食品、奶类及奶制品、人造奶油、发酵食品及其他食品中。还可以利用磷脂中的胆碱、磷脂酰基醇和必需脂肪酸等营养源,以及磷脂对防止老化,改善脂质代谢,改善神经、肝脏、心脑血管系统等的机能,可作为营养健康食品的强化剂^[18]。

3.2 医药工业

大豆卵磷脂作为医药保健品的添加剂已越来越受到重视。它能使血液中的胆固醇和脂肪分解成极小的微粒,防止胆固醇沉积所造成的动脉硬化^[19]。磷脂复合物是生命细胞的重要组成部分,它影响着细胞的生命活力,对细胞膜的渗透性起着重要的作用。此外大豆卵磷脂是人体组织组成的重要成分之一,可以作为日常多聚磷酸胆胺的来源,关系到机体内脂肪、胆固醇的代谢酶系统和脂肪在肝脏的转化作用等。大豆卵磷脂还是脑和神经系统中乙酰胆碱,以及前列腺等活性物质的前体,并能溶解和清除机体内的某些过氧化脂质、活化脑细胞、调节内分泌体系^[20]。

3.3 饲料工业

在饲料工业中,大豆卵磷脂作为饲料添加剂添加到饲料中可起到以下几个方面的作用^[4]:(1)作为油脂代替品,提高饲料能量;(2)提供胆碱、肌醇、亚油酸和亚麻酸等营养素;(3)提高饲料的营养价值,改善饲料的适口性;(4)有助于动物对油脂和脂溶性维生素的消化吸收;(5)保护饲料中的不饱和脂肪酸;(6)提高制粒的物理质量和产量,减少饲料在挤压成形时的粉料损失和能量消耗;(7)降低挤压膨化设备的磨损;(8)防止粉尘飞扬,以及饲料自动分级,提高饲料的混合质^[21]。

3.4 化妆品工业

大豆卵磷脂是一种十分理想的天然化妆品原料,具有较强的表面活性和胶体性质。同时,它又是生物细胞的重要成分之一,在机体细胞代谢和细胞膜渗透性调节方面起着重要作用。大豆卵磷脂对人体皮肤有良好的保湿性和渗透性,具有抗氧化、抗静电、乳化、分散、湿润、渗透、保湿、调理、软化、润肤和柔发等多种功能^[22]。

4 大豆卵磷脂在犬粮中应用前景分析

4.1 提高犬粮利用率和犬生产性能

耿庆辉^[23]的试验表明,在肉鸡日粮中添加2%改性磷脂,可提高增重7%~10%,饲料报酬提高5%~8%;给产蛋鸡喂含1.5%大豆磷脂的饲料,产蛋率提高9.9%,饲料报酬提高9.2%。甘溢凌^[24]进行的大豆磷脂对断奶仔猪的试验表明,添加大豆磷脂组仔猪日增重提高6.8%,节约饲料约5.4%。Qverland等^[25]报道添加6%卵磷脂可显著提高断奶仔猪的增质量、饲料摄入量及饲料转化率。犬具有短而单一的消化道,但喜欢食用肉类含脂肪较

多的食品。特别对于幼犬其消化器官还没有完全发育,对脂肪的消化不利,在犬粮中添加大豆卵磷脂就可以很好地改善脂肪的消化吸收,加速小肠内脂质的乳化,促进脂酶活化。还可以调节脂肪代谢,改善脂质消化机能,尤其是对高饱和脂肪酸的消化机能。但目前大豆卵磷脂在犬粮中以提高饲料利用率和消化率的应用尚未见报道。

4.2 提高犬抗疲劳性

杨艳晖等^[26]经口给予小鼠大豆卵磷脂30天后,采用负重游泳实验,表明大豆卵磷脂能够明显提高小鼠的耐缺氧的抗疲劳能力,增强耐力;能有效提高小鼠血清及肝匀浆中的SOD、GSH-Px活性,降低MDA含量。秦晓健等^[27]也进行了不同剂量大豆卵磷脂对小鼠强迫游泳时间、耐缺氧能力、血清尿素氮、血乳酸、肝糖原含量影响的试验。结果表明,大豆卵磷脂能延长小鼠游泳时间、降低血乳酸含量、提高肝糖原含量。表明了大豆卵磷脂具有抗疲劳作用。犬特别是工作犬在训练过程或执行任务过程中,增强耐力和抗疲劳能力显得尤为重要。大豆卵磷脂在犬粮中的应用将有利于能量物质的积累,延长能量供应时间,增强机体对运动负荷的适应能力,从而延缓疲劳产生。

4.3 提高犬记忆力和学习能力

池莉平等^[28]通过跳台实验、避暗实验及水迷宫试验,对喂饲大豆卵磷脂高、中、低三种剂量的小鼠记忆改善情况进行了观察。结果显示大豆卵磷脂对动物的被动回避反应及空间辨别能力的记忆获得有改善作用,说明了大豆卵磷脂具有改善记忆的功能。Shu ying chung等^[29]利用大鼠做动物实验,证明了卵磷脂有改善记忆的作用。犬在训练或者与人类的休闲沟通过程中,学习能力和记忆力的提高,有助于提高训练效果,使得犬更快的学会更多的技能。还能增进人与犬之间的情趣生活。大豆卵磷脂是乙酰胆碱中胆碱的供体,被小肠吸收后,能水解出胆碱,随血液进入犬大脑,与醋酸结合转化为乙酰胆碱,而乙酰胆碱作为神经细胞间传递信息最主要的神经递质之一,与记忆形成关系密切。

4.4 延长犬的寿命

王岚等^[30]以12个月龄的NIH小鼠为实验动物,对维格尔多大豆卵磷脂进行抗衰老的功能评价。结果显示实验组红细胞中超氧化物歧化酶(SOD)

和全血中的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力明显高于对照组,表明了大豆卵磷脂的抗氧化作用。徐承水^[9]以小鼠为试验动物研究表明卵磷脂能有效提高心、脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低过氧化脂质(LPO)和脂褐素含量,拮抗过氧化损伤,具有明显的抗衰老作用。随着犬在人类生活中地位的提高,特别是伴侣犬、宠物犬,已经逐渐成为家庭中的一员,人们同样关注它们寿命的长短。老年犬行动不便已经给它们的生活带来了许多困扰,也增加了犬主照料它们的时间。对大豆卵磷脂的研究已经显示了其在抗衰老方面重要的作用,在犬粮中的应用将能有效改善犬的生理机能,延长犬的寿命。

4.5 提高犬的免疫力

马挺军等^[31]对小鼠进行了低、中、高剂量大豆卵磷脂连续灌胃30天,结果显示大豆卵磷脂显著增强小鼠单核-巨噬细胞吞噬能力和提高溶血素产生能力,对脾指数影响显著,表明大豆卵磷脂具有增强免疫的作用。机体的免疫力与衰老和多种疾病密切相关,大豆卵磷脂能够增强机体的免疫力,在犬粮中的应用将能有效提高犬的抗病能力,延长犬的寿命。但目前关于大豆卵磷脂提高动物免疫力的研究尚少,机制也不明确,需要进一步完善。

5 问题及展望

大豆卵磷脂吸湿性强,因此在犬粮的储存和运输过程中带来了一定的难度。可以考虑作为饲料预混剂或制作微胶囊饲料时添加。大豆卵磷脂不耐高温,温度在50℃以上,在一定时间内,活性会逐渐被破坏而消失。但是目前商品全价犬粮主要是膨化颗粒料,生产过程中膨化需要经过高温。可以对大豆卵磷脂进行稳定化处理,例如包埋技术。在未经膨化处理工艺生产的犬粮如狗咬胶系列产品,可以改变传统的烘房烘干工艺,采用冷冻干燥等干燥过程,控制温度在50℃以下,就可以保证大豆卵磷脂的活性。基于犬实验研究的特殊性,大豆卵磷脂在犬粮中的研究还比较少,大豆卵磷脂能否影响犬的免疫功能、抗衰老等方面的研究报道也很少,在其他动物也主要集中在营养学方面如生长率和增重率等传统指标的研究上,并且作用机理尚不十分明确。另外,大豆卵磷脂在犬粮中的使用应该根据原料的特点、成本以及犬的年龄、大小、生理特点等来确定其添加量,而目

前对这方面的研究尚少。

随着我国国民经济的迅速发展、人民生活水平的不断提高,犬在人类生活中的地位也在提高。人们越来越关注犬特别是宠物犬毛发、寿命、抗病能力、学习和记忆力等方面的提高。因此功能性犬粮的开发将是以后的发展趋势。国内外许多研究结果表明,大豆卵磷脂作为一种特殊的营养添加剂添加于畜禽日粮中,为动物机体提供能量的同时还可以为动物机体补充一定必需脂肪酸及其它所必需的营养物质,并且能有效改善动物免疫力、记忆力、抗疲劳性等,功能性强;大豆卵磷脂是大豆油精炼过程中的一种副产品,应用于犬粮中,既能充分利用这部分资源,又能促进养殖业、饲料工业和粮油工业的协调发展。随着人们对大豆卵磷脂在畜牧业中的应用研究进一步深入,大豆卵磷脂在犬粮中的研究和应用将会越来越广泛。

参考文献:

- [1] 霍永琛. 大豆卵磷脂的研究进展[J]. 明胶科学与技术, 2007, 27(3):113-117.
- [2] 关润伶, 邹静, 朱红. 大豆磷脂的分离纯化研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005, 5(4):44-47.
- [3] 周爱儒, 查锡良. 生物化学[M]. 第五版. 北京:人民卫生出版社. 2002:123.
- [4] 温海清, 过玉英, 梁海平, 等. 大豆卵磷脂的研究进展及其在动物生产中的应用[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2006(3):4-6.
- [5] 于昱, 汤伟. 卵磷脂的功能特性及其应用[J]. 饲料世界, 2004(3):26-28.
- [6] Barenholz Y, Thompson T E. sphingomyelin in bilayers and biological membranes [J]. Biochim Biophys Acta, 1980, 604:129.
- [7] 李涛, 王天志. 卵磷脂的研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(10):752-756.
- [8] 郑建仙. 功能性保健食品[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1995.
- [9] 徐承水. 卵磷脂抗衰老作用的实验研究[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2000, 17(3):19-20.
- [10] 吴胜芳, 顾小红, 张灏, 等. 卵磷脂的功能特性及其应用[J]. 食品科技, 2001(4):36-38.
- [11] 衣艳君. 卵磷脂对大鼠过氧化损伤的保护作用[J]. 聊城师院学报(自然科学版), 2001, 14(1):73-74.
- [12] 郝征红, 李桂凤, 秦宏伟, 等. 大豆功能性成分综合利用的现状与趋势[J]. 粮油食品科技, 1998(1):9-11.
- [13] 周俊梅. 绿色食品与儿童保健[M]. 广州:华南理工大学出版社, 1998.
- [14] Liang H Q, Rye K A, Barter P J. Remodeling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin:cholesterol acyltransferase[J]. J Lipid, 1996, 37(9):1962.

- [15] Xiaoli Ma, Zhao Jingbo, Lieber Charles S. Phosphatidylcholine attenuates non-alcoholic fibrosis and accelerates its regression [J]. *J Hepatol*, 1996, 24:604.
- [16] Navder KP, Baraona E, Lieber CS. Phosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipemia in rats [J]. *J Nutr*, 1997, 127:1800.
- [17] Safford F, Barry Baumel. Testing the effects of dietary lecithin on memory in the elderly: An Example of Social Work/ Medical Research Collaboration [J]. *Research on Social Work Practice*, 1994(4):349.
- [18] 刘立国. 大豆卵磷脂——多功能的食品添加剂 [J]. *中国食品添加剂*, 2003(21):263-268.
- [19] 卢义伯, 潘超. 大豆功能因子的研究进展 [J]. *现代食品科技*, 2007, 23(2):104-108.
- [20] 齐文娟, 岳红卫, 王伟. 大豆磷脂的理化特性及其开发与应用 [J]. *中国油脂*, 2005, 30(8):35-37.
- [21] 孙燕军, 朱振凯. 卵磷脂在水产动物营养中应用研究 [J]. *兽药与饲料添加剂*, 2004, 9(6):25.
- [22] 蔡卓, 程龙军, 江彩英, 等. 大豆卵磷脂的研究现状 [J]. *化工技术与开发*, 2008, 37(9):34-37.
- [23] 耿庆辉. 大豆磷脂在肉鸡生产中的应用 [J]. *饲料研究*, 1996(2):24-25.
- [24] 甘溢凌. 大豆卵磷脂在断奶仔猪日粮中的应用效果 [J]. *兽药与饲料添加剂*, 2000(2):7.
- [25] Qverland M, Sundstol F. Effect of lecithin on fat digestion by weanling pigs [J]. *Livest Prod Sci*, 1995(41):217-224.
- [26] 杨艳晖, 潘洪志, 宋柏捷, 等. 大豆卵磷脂对小鼠的抗疲劳和抗氧化作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(21):4024-4026.
- [27] 秦晓健, 马挺军, 贾昌喜. 大豆卵磷脂抗疲劳活性研究 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(12):48-50.
- [28] 池莉平, 朱展鹰, 黄俊明, 等. 大豆卵磷脂改善记忆作用动物实验研究 [J]. *中国热带医学*, 2006, 6(11):1945-1946.
- [29] Shu Ying chung, Tomoe Mofiyama, Eiko Uezu. Administration of Phosphatidylcholine Increases brain acetylcholine concentration and improves memory in mice with dementia [J]. *Journal of Nutrition*, 1994, 12:1484-1489.
- [30] 王岚, 李书香. 维格尔大豆卵磷脂抗衰老作用的实验研究 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2001, 24(5):283-284.
- [31] 马挺军, 秦晓健, 贾昌喜. 大豆卵磷脂增强免疫活性的研究 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(15):97-99.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊,大16开本,正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会、广东省农业科学院动物科学研究所、广东省农业科学院动物卫生研究所

订 价:每期定价 5.5 元,全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式:本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

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

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

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

糖皮质激素类药物在宠物临床中的使用准则

刘健红¹, 张善财²

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631; 2. 广东华昊农业技术开发研究院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S858.292

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0041-03

1 糖皮质激素类的药理学作用

糖皮质激素(glucocorticoid,GCS)是由肾上腺皮质中束状带细胞分泌的一类甾体激素^[1],主要为皮质醇(cortisol),具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和分解代谢作用,此外还具有抑制免疫应答、抗炎、抗毒素、抗休克等药理学作用^[2]。

1.1 抗炎作用

GCS有快速、强大而非特异性的抗炎作用。对各种炎症均有效。在炎症初期,GCS抑制毛细血管扩张,减轻渗出和水肿,又抑制白血细胞的浸润和吞噬,而减轻炎症症状。在炎症后期,抑制毛细血管和纤维母细胞的增生,延缓肉芽组织的生成,而减轻疤痕和粘连等炎症后遗症^[3]。

1.2 免疫抑制作用

GCS抑制免疫细胞对抗原的吞噬和处理;促进淋巴细胞的破坏和解体,促其移出血管而减少循环中淋巴细胞数量;小剂量时主要抑制细胞免疫;大剂量时通过抑制浆细胞活性和抗体的生成从而抑制体液免疫功能^[4]。

1.3 抗休克作用

(1)解热作用:GCS可直接抑制体温调节中枢,降低其对致热原的敏感性,又能稳定溶酶体膜而减少内热原的释放,而对严重感染,如败血症、脑膜炎等具有良好退热和改善症状作用。(2)降低血管对某些缩血管活性物质的敏感性,使微循环血流动力学恢复正常,改善休克症状^[5]。

1.4 抗毒素作用

GCS可直接抑制体温调节中枢,降低其对致热原的敏感性,具有良好的退热作用;又能稳定溶酶体膜和降低血管对某些缩血管活性物质的敏感

性,有明显的缓解毒血症中毒症状的作用,从而提高机体对毒素的耐受性^[6]。

但是必须注意:(1)GCS既不能中和内毒素,也不能破坏内毒素,对外毒素亦无作用;(2)GCS在抑制炎症、减轻症状的同时,也降低了机体的防御功能,使用时必须同时应用足量有效的抗菌药物,以防炎症扩散和原有病情恶化^[7]。

2 糖皮质激素类药物在宠物临床中的应用原则

宠物临床上较为常用的糖皮质激素类药物主要包括:醋酸可的松、醋酸泼尼松、甲基氢化泼尼松、可的松、氢化可的松、氢化泼尼松、地塞米松、去炎松等。肌肉注射最常用的是地塞米松,外用氢化可的松,口服的通常是醋酸泼尼松或甲基氢化泼尼松。这类药物应用广泛,但副作用也不少,使用时应特别注意以下几个方面:

2.1 严格掌握糖皮质激素治疗的适应症

糖皮质激素是一类临床适应症尤其是相对适应症较广的药物,因此造成临床应用的随意性较大,未严格按照适应症给药的情况较为普遍,如单纯以退热和止痛为目的使用糖皮质激素,特别是在感染性疾病中以退热和止痛为目的使用。糖皮质激素有抑制自身免疫的药理作用,但并不适用于所有自身免疫病治疗,如慢性淋巴细胞浸润性甲状腺炎(桥本病)、I型糖尿病、寻常型银屑病等^[8]。

2.2 合理制订糖皮质激素的治疗方案

糖皮质激素治疗方案应综合患病动物的病情及药物特点制订,治疗方案包括选用的药物品种、剂量、疗程和给药途径等。

2.3 严格遵守史考特(Danny W.Scott)原则

(1) 只有在危害更小的其他治疗方法失败时才使用; (2) 尽可能使用最小的有效剂量。

3 糖皮质激素类药物在宠物临床中的适用范围

在宠物临床中的许多情况下, 糖皮质激素治疗仅是疾病综合治疗的一部分。应结合病例实际情况, 联合应用其他综合治疗手段, 如严重感染病例, 在积极有效的抗感染治疗和各種支持疗法的前提下, 为缓解症状, 确实需要的可使用糖皮质激素。以下所列爲宠物临床中可以使用糖皮质激素类药物的几种情况:

(1) 用于急慢性肾上腺皮质功能减退综合症、垂体前叶功能减退综合症或肾上腺切除后的糖皮质激素的补充或替代。(2) 在应用有效的抗菌药物治疗严重感染为前提的同时, 作为短期性辅助治疗。(3) 用于防止某些炎症的后遗症, 如脑炎、风湿性心瓣膜炎、非特异性眼炎等。(4) 用于脏器移植后的抗排斥反应或其他过敏性免疫性疾病。(5) 抗休克、血液病、抗肿瘤等。(6) 局部抗炎、抗过敏使用。

4 部分糖皮质激素类药物的选择、剂量及使用方法

氢化泼尼松的预期作用时间为 1 天, 最适合每天给药, 效价稍高的甲基氢化泼尼松可每 2~3 天给药 1 次。应尽可能口服, 肌注也可。氢化泼尼松、甲基氢化泼尼松用于抗炎、抗过敏时按每天每千克体重 0.5~1 mg 给药, 抗肿瘤或免疫抑制时按每天每千克体重 2 mg 给药。

炎症型皮肤疾患, 一般选用作用时间短的氢化泼尼松、甲基氢化泼尼松和去炎松, 必要时还可配合抗组胺药物使用, 一般作为局部应用。

自身免疫性疾病, 如天疱疮、类天疱疮、红斑狼疮样征候群、自身免疫溶血性贫血、血细胞形成异常、免疫性血小板减少症等情况下, 糖皮质激素为首选药^[9]。初期用氢化泼尼松、甲基氢化泼尼松, 每天每千克体重 2.2~6.6 mg, 适用 7~10 天后遵医嘱使用。

为保护下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴, 减少糖皮质激素副作用的产生^[2], 需要长期给药的病例, 多选用氢化泼尼松。应有 5~7 天的导入期, 每千克体重 0.5~1 mg 的氢化泼尼松, 每天 2

次; 接着作为前驱期约 7~14 天, 按每千克体重 1~2 mg, 每两天给药一次; 再按周半量衰减法定出最低维护期的量, 一般为每千克体重 0.5 mg, 每天一次。

地塞米松药效较强, 近年来使用较为普遍。地塞米松原则上是一次性给药, 每天每千克体重 0.25 mg。一般是注射方式给药。

糖皮质激素药物用于犬类宜于早晨 7-10 时给药, 此时对 HPA 轴的抑制最小副作用最轻。猫的 ACTH 周期性和犬类不同, 故宜在夜间 10-12 时给药, 此时其不良作用最轻^[10]。

5 监测糖皮质激素类药物的不良反应

糖皮质激素的不良反应与用药品种、剂量、疗程、剂型及用法等明显相关。在使用中应密切监测不良反应, 如感染、代谢紊乱(水电解质、血糖、血脂)、体重增加、出血倾向、血压异常、骨质疏松、股骨头坏死等, 幼畜应监测其生长和发育情况^[11]。

6 停药反应和反跳现象

由于外源糖皮质激素与内源糖皮质激素之间存在较强的负反馈调节机制, 大量长期使用外源糖皮质激素往往使得内源糖皮质激素的分泌量受到较强的抑制^[8], 而且不易马上恢复。因此临床上对外源性糖皮质激素的增量或减量应严密观察病情与糖皮质激素之间的关系, 要注意可能出现的以下现象:

6.1 停药反应

中、长期或大剂量使用糖皮质激素时, 减量过快或突然停用可出现肾上腺皮质功能减退样症状。

6.2 反跳现象

在长期使用糖皮质激素时, 减量过快或突然停用可使原发病复发或病情加重。此时应恢复糖皮质激素治疗并常需加大剂量, 稳定后再依据一定慢慢减量。

7 禁忌症

糖皮质激素类药物, 虽然作用广泛、药效强劲, 在多种宠物疾病的治疗中都有很好的临床使用价值。但它们毕竟是一种激素类药物, 有着绝对不可忽视的副作用。对于下述几种特定病理生理情况下的临床病例尤其需要谨慎使用:

(1) 曾患或现患严重的癫痫、神经症状或神经

性疾病;(2)消化道溃疡、角膜溃疡或其他溃疡性疾病;(3)新近的胃肠吻合术、骨折手术、创伤或其他手术愈合期;(4)肾上腺皮质机能亢进引起的皮炎、瘙痒等皮肤病症状;(5)严重高血压、糖尿病及动物妊娠期间;(6)抗菌或抗病毒药物不能控制的感染性疾病等;(7)保守性子宫蓄脓或菌毒血症等病例,应严格禁止使用^[12]。

参考文献:

- [1] Jeffery N. Miner Bob Ardecky, et al. Ant-inflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein-protein interaction profile[J]. Biochemistry, 2007, 21-23
- [2] 刘暖琴. 糖皮质激素:生长激素分泌的强效抑制剂和刺激剂[J]. 国外医学. 内分泌学分册, 1991(4):125-138.
- [3] Thomas Weichhart, et al. The anti-inflammatory potency of dexamethasone is determined by the route of application in vivo [J]. Immunology Letters, 2010, 129(1):50-52.

- [4] 王卫亮, 谢汝汉, 刘奉彬, 等. 蓝科肤宁治疗面部糖皮质激素依赖性皮炎疗效观察[J]. 吉林医学, 2012, 33(15):3145-3146.
- [5] 陈向芳, 余裕民, 沈继龙, 等. 多发性肌炎/皮肌炎患者糖皮质激素治疗前后其受体的改变及意义[J]. 上海免疫学杂志, 2001(5):21-23.
- [6] 李秀, 张凤山, 于慧敏. 糖皮质激素受体与自身免疫性疾病[J]. 中华风湿病学杂志, 2004(5):59-60.
- [7] 张玉玲, 李明, 朱芸. 糖皮质激素受体与结缔组织病关系的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012(20):92-94.
- [8] 张禾田, 孟令军, 卜彤阳. 地塞米松对重症感染手术病人血浆皮质醇、胰岛素和血糖变化的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1997(6):96-98.
- [9] 刘志民, 顾明君, 张慧, 等. 肾上腺皮质功能紊乱患者外周血白细胞糖皮质激素受体的改变及意义[J]. 第二军医大学学报, 2003(5):83-85.
- [10] 陈雪萍, 陈向芳, 邹俊杰, 等. 溃疡性结肠炎鼠糖皮质激素受体改变的意义[J]. 第二军医大学学报, 2007(7):106-107.
- [11] 王德杰, 刘兴国, 张东. 糖皮质激素受体的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010(8):83-85.
- [12] 邱吉芬. 糖皮质激素:滥用易惹祸[N]. 医药经济报, 2001(03-02):2(B).

2014“永顺杯”优秀论文评选启事

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

1、**评选范围:**本刊2014年度1-6期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文16篇,分设一等奖2篇、二等奖4篇、三等奖10篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:**总奖金20000元,由广东永顺生物制药股份有限公司赞助。其中一等奖奖金2000元/篇;二等奖奖金1500元/篇;三等奖奖金1000元/篇。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2014年1月20日

中职畜牧兽医专业人才需求调查及专业改革探索研究

陈 琼, 刘鹤翔, 欧阳叙向

(湖南生物机电职业技术学院, 湖南 长沙 410127)

摘 要: 通过了解湖南省养殖行业人才需求情况和人才培养要求, 为制订中等职业学校畜牧兽医专业教学标准提供全面、客观的依据, 本项目组对湖南省养殖行业、养殖行业的龙头企业、开设有畜牧兽医专业的中等职业学校及中等职业学校畜牧兽医专业的毕业生等进行了详细调研。调研结果表明, 中职畜牧兽医专业毕业生就业岗位主要集中在饲养管理、兽医服务和营销服务等3个岗位群中; 中职畜牧兽医专业课程教学改革迫在眉睫; 湖南省养殖行业人才需求缺口很大, 企业工作岗位要求文化基础知识达到中等职业学校毕业水平, 在专业技能方面因职业岗位不同, 技能要求的侧重点也不同。

关键词: 中等职业学校; 畜牧兽医专业; 人才需求; 专业改革

中图分类号: S851.63

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2014)01-0044-06

根据《湖南省建设教育强省规划纲要(2010-2020年)》、《关于印发〈湖南省职业教育服务能力提升专项规划〉的通知》(湘教发[2011]49号)等有关文件精神, 为进一步推动专业教学改革, 提升湖南省中等职业学校专业建设总体水平, 受湖南省教育厅教科院委托, 湖南省中等职业学校畜牧兽医专业教学标准开发项目组承担了湖南省中等职业学校畜牧兽医专业教学标准(含技能抽查标准)的开发工作。为做好标准开发工作, 项目组成员进行了全面的调研工作。重点调研了湖南省养殖行业、养殖行业的龙头企业、开设有畜牧兽医专业的中等职业学校及中等职业学校畜牧兽医专业的毕业生等。了解相应行业的人才结构现状、行业企业人才需求状况、企业岗位设置及对人才结构类型的要求、岗位对知识技能的要求、相应的职业资格要求等。

1 调研目的

通过行业和企业调研, 主要反映出相应行业的人才结构现状、行业企业人才需求状况、企业岗位设置及对人才结构类型的要求、岗位对知识技能的要求、相应的职业资格要求。通过学校和毕业生调研, 了解现行专业教学情况、学生就业去向、学生继续学习的要求与培养现状、企业对现行专业教学的要求与建议等, 为制订中等职业学校专

业教学标准提供比较全面、客观的依据。

2 调研方法与内容

2.1 调研方法

网上调研、问卷调查、实地参观、现场访谈、实践专家研讨会、毕业生5年跟踪反馈调查。

2.2 调研内容

2.2.1 行业调研 重点调研相关行业发展规划要求(以国民经济和社会发展规划“十二五”规划为依据)、相关行业发展现状(行业经济增长方式转变及国际化发展趋势)、行业人才结构现状及需求、中高等职业教育供求状况、相关行业文化及职业道德素养状况。

2.2.2 企业调研 重点调研相关企业技术变化、运营方式变化、劳动组织变化等内容而导致的专业培养目标变化要求, 以及岗位职业能力的变化情况。

2.2.3 学校调研 重点调研现行专业教学计划的实施情况(专业教学计划的执行情况、存在问题、课程结构比例等)、学校生源及就业升学状况。

2.2.4 毕业生调研 重点调研中等职业学校畜牧兽医专业毕业生毕业岗位变化情况。

3 调研分析

3.1 行业现状及发展分析

3.1.1 湖南省畜牧业发展状况 畜牧业是关系到

国计民生的基础性战略产业。中共中央 9 个关于“三农”问题的 1 号文件中均把大力发展畜牧业和优化畜牧业产业结构作为吸纳农村剩余劳动力,增加农民收入的重要途径。中央财政自 2007 年以来每年向湖南省畜牧业投入各项扶持资金 10 亿元以上,占中央财政同类资金比重的 10%。使得“十一五”期间湖南省畜牧业持续稳定发展,综合生产能力大幅提高,占农业总产值 3 596 亿元的比重达到 44.44%(全国仅占 33%),比 2005 年的 40.6%提高 3.84 个百分点。2011 年出栏生猪 8 060 万头,生猪存栏 4 770 万头,牛、羊、家禽分别出栏(笼)184 万头、735 万只、6.1 亿羽,商品饲料产量首次突破 1 000 万吨,全年养殖业产值 1 600 亿元。生猪出栏量居全国第 2 位,外销量全国第 1 位,饲料工业是全国五大强省之一,畜牧产量居全国第 6 位,产值居全国第 5 位。湖南省已成为全国 5 大畜牧强省之一。

尽管湖南畜牧业在“十一五”取得了巨大的成就,但是产业化的程度依然较低。突出的表现在:目前有 195 万个养殖户,规模养殖场仅 52 万个,散户型养殖的比重仍然很大,致使畜产品的质量安全不能得到有效控制,食品安全事故多发。所以,“十二五”期间湖南省畜牧业面临四大挑战:一是生产方式转变的挑战;二是质量安全的挑战;三是科技增

产增效的挑战;四是发展空间挤压的挑战。

为此,湖南省“十二五”畜牧业发展的主要目标是:优化区域布局,大力推行规模化经营、标准化生产、组织化管理,全面提升生态和健康养殖水平。积极引导适度规模畜禽养殖,由“千家万户”小生产为主向“适度规模和区域连片”为主转变。到“十二五”期末,湖南省生猪规模养殖比重达到 70%,家禽规模养殖比重达到 70%以上,肉牛规模养殖比重达到 30%以上,肉羊规模养殖比重达到 45%以上,奶牛规模养殖比重达到 85%以上。畜禽产品加工率提高到 30%以上。畜牧业现状与目标见表 1。

行业企业调研表明:“十二五”期间,湖南省畜牧业预计新增规模养殖企业 5.549 万个,至少需要 5.5 万个创业者、高端技能型(生产一线技术主管、执业兽医师、饲料兽药销售区域经理等)人才 10 万人;基层技能型(饲养员、防疫员、饲料兽药营销员等)人才 50 万人;需要培训新增从业人员 16.2 万人。各类人才需求达 80 余万人。

3.1.2 湖南省畜牧兽医人才培养现状 湖南省的中等职业学校养殖类专业有 53 所学校招生,在校生 4 872 人,年毕业生 1 630 人。高职学校有 9 所招收畜牧兽医专业,在校生 1 575 人,2012 年毕业生 562 人。本科学校只有 1 所,每年毕业生 240

表 1 湖南省畜牧业现状与“十二五”发展目标

指 标	“十一五”现状			“十二五”目标	
	2010 年数量	“十一五”规模化比重	比“十五”提高	2015 年规模化目标	“十二五”新增规模化养殖户
生猪出栏 50 头以上规模养殖户(万户)	27.6	58%	19%	70%	3.312
蛋禽 500 羽以上规模养殖户(万户)	8.4	66%	18%	70%	0.336
肉禽 2000 羽以上规模养殖户(万户)	9.3	55%	20%	70%	1.395
肉牛出栏 10 头以上规模养殖户(万户)	2.33	28%	16%	30%	0.047
羊出栏 30 只以上规模养殖户(万户)	4.39	35%	21%	45%	0.439
奶牛存栏 20 头以上规模养殖户(万户)	0.01	65%	12%	85%	0.020
合 计	52.03				5.549
标准化养殖小区(个)	3850			每县建 3-5 个	300
乡镇级、村级专职动物防疫员(万人)	4.57			培训 1 万人	1
品种改良人员(万人)	2.5			培训 0.2 万人	0.2
畜牧业产业从业人员(万人)	300			培训 5 万人	5
农民转移就业人员(万人)	100			培训 10 万人	10
合 计	407.07				16.2

人(动物科学 120 人、动物医学 120 人)。目前中等职业、高职、本科学校每年毕业生合计仅 2 430 人。与“十二五”期间 80 多万技能型人才的需求比较是杯水车薪。湖南省近 3 年畜牧兽医专业毕业生的供需比达 1:17,行业人才需求缺口很大。

3.2 企业人才需求分析

为明确中等职业学校畜牧兽医专业职业能力要求,组织调研了 64 家相关企业。具体包括养猪 26 家、养禽 10 家、兽医服务 11 家、兽药生产 7 家和饲料生产 10 家。中等职业学校畜牧兽医职业能力包括文化基础知识和专业技能两方面,其中专业技能指饲料加工与日粮配合技术、动物繁殖技术、畜禽生产技术、兽医实验室检验技能、兽医临床诊疗技术、动物防疫技术^[1]。

3.2.1 文化基础知识要求 据统计,企业对一线员工的语文、数学、物理、化学、英语等文化基础知识须达到高中水平的比例分别为 88%、64%、49%、51%、28%。见表 2。

表 2 毕业生须具备的文化基础知识

科目	单位:%				
	高中	初中	小学	无要求	合计
语文	88	7	3	2	100
数学	64	34	0	2	100
物理	49	25	6	20	100
化学	51	49	0	0	100
英语	28	35	2	35	100

3.2.2 专业技能要求

3.2.2.1 饲料加工与日粮配合技能 原料种类识别技能在畜禽养殖岗位上应用比例在 80%以上;饲料加工和日粮配合技能在兽医服务岗位上要求不高;在兽药营销岗位上,饲料加工与日粮配合技能作用比较少;在饲料营销岗位上,饲料加工技能、配合饲料调制等技能应用比例都大大超过了 70%。见表 3。

3.2.2.2 动物繁育技能 除精液冷冻保存技术外,其他的动物繁育技能在养畜岗位上应用非常普遍;养禽岗位上需要掌握的动物繁育技能有精液品质检查、输精技术、采精技术等;发情鉴定、妊娠诊断、稀释液配制等动物繁育技能在兽医服务岗位上应用较多;动物繁育技能在兽药、饲料营销岗

表 3 不同岗位对毕业生的饲料加工与日粮配合技术需求
单位:%

岗位	饲料加工技能			日粮配合技能		
	原料种类识别	常规成分分析	饲料加工与调制	日粮配制	日粮分析检测	配合饲料调制
养畜	85	45	40	65	52	51
养禽	83	63	67	58	47	52
兽医服务	28	37	53	48	24	45
兽药营销	65	52	19	48	35	19
饲料营销	90	90	76	58	57	76

表 4 不同岗位对毕业生的动物繁育技术需求

单位:%

岗位	发情鉴定	妊娠诊断	稀释液配制	精液冷冻保存	精液品质检查	输精技术	采精技术
养畜	81	78	79	58	77	75	73
养禽	54	45	45	55	75	73	82
兽医服务	74	72	71	63	60	64	50
兽药营销	32	32	32	32	32	32	18
饲料营销	66	54	66	69	55	56	66

位上应用较少。见表 4。

3.2.2.3 畜禽生产技术 养畜岗位上的主要技能是猪生产技术;禽生产技术在养禽岗位上应用广泛;仔猪培育、肥猪育肥技术在兽医服务岗位上应用较多;在兽药营销岗位中,畜禽生产技能应用少;在饲料营销岗位上,猪生产技术、禽生产中育雏技能应用广泛。见表 5。

表 5 不同岗位对毕业生的畜禽生产技术需求

单位:%

岗位	猪生产技术			禽生产技术		牛、羊、兔生产技术		
	母猪接产	仔猪培育	育肥技术	孵化技术	育雏技术	品种识别	繁殖技术	饲养技术
养畜	79	78	76	24	27	27	26	26
养禽	28	35	25	74	78	26	0	16
兽医服务	56	77	70	42	63	62	51	56
兽药营销	32	32	32	32	15	0	0	0
饲料营销	76	89	79	43	72	11	0	28

3.2.2.4 兽医实验室检验技能 在养畜岗位上,实验室规则和安全防护技能运用广泛;绝大部分兽医实验室检验技能在养禽岗位生产中应用较少;兽医实验室检验技能中实验仪器的使用以及

实验室规则和安全防护、病原体检查、临床化验在兽医服务岗位生产中要求高;在兽药营销岗位和饲料营销岗位中兽医实验室检验技能作用不明显。如表 6。

3.2.2.5 兽医临床诊疗操作技能 在养畜岗位中畜禽尸体剖检、制订并实施动物疾病治疗方案等

技能非常重要;家禽尸体剖检技能在养禽岗位的比例达 91%;兽医临床诊疗操作能力在兽医服务岗位生产中应用广泛;问诊与临床检查、尸体剖检等技能是兽药营销岗位的重点技能;在饲料营销岗位上,仅制订并实施动物疾病治疗方案应用比较多。如表 7。

表 6 不同岗位对毕业生的兽医实验室检验能力需求

单位:%

岗位	高压灭菌器扫使用	离心机的使用	恒温培养箱的使用	生物显微镜的使用	实验室规则和安全防护	病原体检查	临床化验	免疫学检查
养畜	38	17	29	58	75	48	42	21
养禽	36	18	55	27	55	45	50	18
兽医服务	64	50	71	64	71	79	79	43
兽药营销	50	33	33	17	50	0	33	17
饲料营销	33	11	11	44	50	44	22	22

表 7 不同岗位对毕业生的兽医临床诊疗操作能力需求

单位:%

岗位	问诊与临床检查	尸体剖检	制订并实施动物疾病治疗方案
养畜	67	75	83
养禽	55	91	55
兽医服务	87	86	93
兽药营销	83	83	67
饲料营销	56	67	78

3.2.2.6 动物防疫技能 动物防疫技能是养畜岗位中应用比较普遍的技能;免疫技术、消毒技术在养禽岗位生产中应用广泛;兽医服务人员须全面掌握动物防疫技能;除疫情报告技能外,其他动物防疫技能在兽药营销岗位上应用非常广泛,比例分别达到了 85%、73%;杀虫和灭鼠技能在饲料营销岗位上应用比例最高,达到 89%,其它的技能应用也比较广泛。如表 8。

表 8 不同岗位对毕业生的动物防疫能力需求

单位:%

岗位	疫情调查分	疫情报告	疫情处理	防疫计划实施	杀虫和灭鼠技术	免疫技术	药物预防技术	消毒技术
养畜	79	75	88	83	71	79	79	71
养禽	45	36	64	55	45	82	64	73
兽医服务	86	79	93	86	79	86	93	100
兽药营销	73	33	85	85	73	85	85	85
饲料营销	67	67	67	67	89	67	67	78

3.3 学校人才培养分析

通过采访和问卷调查方式,调查了湖南省开设有畜牧兽医专业的四个中等职业学校。具体情况如下:

3.3.1 人才培养目标明确合理 畜牧兽医专业是实用性专业,其适应性非常广,是农业院校的传统特色专业,学生就业率特别高,培养高质量的实用型畜牧兽医专业技术人才具有广阔的前

景。因此各个中等职业学校为提高本校的知名度,扩大学生生源,让本校畜牧兽医专业办学进入良性循环,使畜牧兽医专业办得更具特色,使畜牧兽医专业毕业生在就业市场更具优势,都非常重视专业人才培养目标的定位,都会花大力气通过专家咨询或市场调研等形式确定人才培养目标,所以人才培养目标的定位非常明确,也比较合理。

3.3.2 课程体系改革迫在眉睫 作为中等职业学校的畜牧兽医专业来讲,课程体系存在的问题集中表现在课程体系构建方法不当、结构不合理、课程内容陈旧与重复交叉、课程名称无法体现职教特色等方面。传统的课程体系注重畜禽生产与畜禽疾病防治等方面职业能力的培养,忽视了经营与管理、市场营销及宠物驯养与保健美容等方面职业能力的培养^[2]。

3.3.3 师资队伍建设和任重道远 中等职业学校畜牧兽医专业教师年龄结构明显不合理。从调查的情况来看,老(50岁以上),中(36-49岁)、青(35岁以下)的专业教师为数分别占8.3%、35.6%和56.1%,青年教师偏多,相比之下,有教学经验的中老年教师略显不足。

中等职业学校畜牧兽医专业教师职称结构也不合理。调查数据显示,专业教师中,高级职称、中级职称、初级职称和未评或无职称的比例分别为10.3%、57.1%、22.8%和9.8%,远低于国家规定的具有高级专业职务专任教师25%的比例;而“双师

型”教师只占22.7%,这与《湖南省教育人才中长期发展规划(2011-2020年)》中提出的到2015年,“双师型”教师比例中职教育达到75%的要求还有很大差距。

3.3.4 实验仪器设备严重不足 据统计,目前我国的教育投入约占国民生产总值的3%,低于世界5%的平均水平。长期以来,由于对中等职业学校的投资经费不足,学校长期不添置、不更新实验仪器设备;专业教师缺乏以及教学经验不足。使得实验室设备陈旧并且数量不足,学生最基本的实验课难以开展。另外,一些学校没有专业实训基地,师生外出参观学习的机会不多也不方便,使得学生的实践课和实践活动的开展更得不到保证。于是,在一些中等职业学校畜牧兽医专业的课堂上出现了“黑板上养猪,教室里放牧”的现象。但是,畜牧兽医专业是理论性、实践性、专业性都很强的专业,直观教具、标本模型、实际操作都非常重要。因此,这样培养出来的学生只会背理论,不能动手操作解决生产中的实际问题,直接影响到培养的专业人才质量。

3.4 毕业生就业情况分析

通过调查问卷和实地采访方式,调查2008-2011届668位畜牧兽医专业毕业生的就业岗位、职业分布等情况。根据历届毕业生就业去向,将毕业生就业岗位概括为饲养管理、兽医服务、营销服务、动物繁殖、宠物及特种动物服务、化验检测检疫、产品加工、监督管理、技术推广研究与试验、其

表9 2008~2011届毕业生就业岗位情况

就业岗位	2008届		2009届		2010届		2011届		合计	
	人数	比例(%)	人数	比例(%)	人数	比例(%)	人数	比例(%)	人数	比例(%)
饲养管理	79	37.6	106	42.7	45	41.3	47	46.5	277	41.5
兽医服务	41	19.5	38	15.3	25	22.9	23	22.8	127	19.0
营销服务	34	16.2	50	20.2	19	17.4	18	17.8	121	18.1
动物繁殖	15	7.1	15	6.0	6	5.5	2	2.0	37	5.5
宠物及特种动物服务	4	2.0	5	2.0	3	2.8	6	5.9	18	2.7
化验检测检疫	5	2.4	6	2.4	1	0.9	0	0	12	1.8
产品加工生产	0	0	6	2.4	0	0	2	2.0	8	1.2
监督管理	2	1.0	1	0.4	0	0	0	0	3	0.4
技术推广研究与试验	0	0	1	0.4	0	0	0	0	1	0.1
其他工作	30	14.3	20	8.1	9	8.3	3	3.0	62	9.3
合计	210	100	248	100	109	100	101	100	668	100

他工作等 10 个岗位群进行调查。具体情况如下:

就业岗位主要集中在饲养管理、兽医服务、营销服务岗位群。从表 9 可知,饲养管理、兽医服务、营销服务等 3 个岗位群就业的毕业生分别为 277 人、127 人、121 人,分别占调查总数的 41.5%、19.0%、18.1%,累计占 78.6%。表明毕业生就业岗位集中在饲养管理、兽医服务、营销服务岗位群中。饲养管理、兽医服务、营销服务岗位就业人数的比例为 2.29:1.05:1。由此可见,饲养管理岗位群的就业人数是最多的,超过兽医服务和营销服务两个岗位群的总和,是毕业生最主要的就业方向^[3]。

从动态看,2008~2011 年四届毕业生在饲养管理岗位就业人数分别占当年毕业人数的 37.6%、42.7%、41.3%、46.5%,在兽医服务就业人数分别占当年毕业人数的 19.5%、15.3%、22.9%、22.8%,在营销服务岗位就业人数分别占当年毕业人数的 16.2%、20.2%、17.4%、17.8%。就业比例上保持相对稳定。

除饲养管理、兽医服务、营销服务外,按照就业比例从大到小顺序排列的就业岗位群分别为“其他工作”、动物繁殖、宠物与经济动物服务、化验检测检疫、产品加工生产、监督管理、技术推广研究与试验。

4 专业建设思考

中等职业学校畜牧兽医专业应该培养能适应社会主义经济建设需要,德、智、体、美、劳全面发展,掌握畜牧兽医行业工作所必需的基础理论知识和基本技能,胜任畜牧业生产、经营及建设,服务于生产第一线需要的具有掌握畜禽饲养、动物疾病防治技术、饲料兽药营销技术的高素质技能型专门人才。

4.1 对课程设置的建议

随着畜牧兽医行业的不断发展,职业岗位及其能力要求发生了很大变化。因此,必须以职业能力培养为核心,以技能训练为主线,以培养目标作为教学内容取舍与结构组合的标准^[4]。按照职业岗位(群)对本专业知识、技能、素质的要求整合课程,精简课程门类,避免交叉重复。在课程整合过程中,要强调课程内容的实用性、基础性与综合性,突出专业技能与职业能力的培养。要突破传统

的“公共基础课、专业基础课、专业课”三段式课程体系结构与思路,根据专业技术领域和职业岗位的任职要求,以畜牧兽医行业主要岗位的生产流程为主线,以实践性教学为主体,开发“专业核心课程+专业拓展课程”两段式课程体系,将理论教学融入实践教学中,构建“教、学、做”一体化的课程体系。

专业核心课程是以培养专业核心职业能力为目的的课程,以不同专业方向之间的共同职业能力为基础加以设计。要避免以“知识”代替“能力”设计课程的倾向,要减少理论教学时间,保证实践技能操作训练时间。专业拓展课程是对专业核心课程的扩充,在学习过程中,允许学生按照个人兴趣与就业需要进行选择性学习,使学生主动适应职业岗位,增强教学的职业针对性,充分体现教学过程中学生的主体地位,以有利于学生职业、就业、创业能力的培养。

4.2 对教学模式改革的建议

目前,湖南省中等职业学校畜牧兽医专业按教育部的指导意见,推行“2+1”的教学模式,即:学生在校学校 2 年,外出在企业顶岗实习 1 年。然而学生在校的教学如何进行,在技能型人才培养上如何实现与企业需求的对接,都应对畜牧兽医专业教学模式进行了大胆的创新。

要转变“满堂灌”的课堂教学,突出培养学生综合技能。课堂教学主要介绍基本知识,引导、启发学生通过听课、问答、讨论、设计和实践操作等以学生为主体的教学方式学习,以提高学习效果。

要重点推行现场教学,注重学生职业素质和综合能力的培养。畜牧兽医是实践性很强的专业,大量的知识和技能需要在生产实践的现场来完成,因此在教学方法上要做到:一是深入生产企业,全班分期、分批进入养殖场开展现场教学,增强教学的针对性与实践性;二是采用“师傅带徒弟”的方法,经过轮岗训练,手把手地教会学生主要的职业技能;三是聘用生产企业技术人员作指导教师,以专题报告的形式介绍生产经验。

要以网络和多媒体为基础,大力推广现代教育技术。如教学内容中的品种识别、畜禽饲养管理、饲料配合、人工授精、设备观摩、养殖场

(下转第 52 页)

猪口蹄疫免疫失败的原因和对策

黄万世, 吕英然, 周汉柱, 张守栋, 李祖文
(广东省高州农业学校, 广东 高州 525200)

摘要: 猪口蹄疫免疫失败的原因包括疫苗、免疫程序、免疫操作、饲养管理和猪群健康等因素。提高免疫效果, 必须提高疫苗质量, 制定科学免疫程序, 确保免疫密度, 提高猪群健康水平等综合防控措施, 才能取得良好效果。

关键词: 口蹄疫; 免疫失败; 原因; 对策
中图分类号: S855.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1005-8567(2014)01-0050-03

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病。猪很易感染。各国对猪口蹄疫的防控十分重视, 目前, 我国实行以强制免疫为主的口蹄疫防控措施。近年来, 个别猪场出现猪群免疫后仍发生口蹄疫的情况, 甚至有发病猪群康复后部分猪只重复感染口蹄疫的现象。根据笔者在广东茂名地区对猪口蹄疫的防控调查, 结合猪口蹄疫免疫程序研究的结果, 就当前猪口蹄疫免疫失败的原因进行分析, 提出相应的对策。

1 免疫失败原因分析

1.1 疫苗因素

1.1.1 免疫剂量不足 免疫剂量是影响猪口蹄疫免疫效果的主要因素。我们在调查中了解到, 养猪户按照疫苗使用说明书接种猪口蹄疫疫苗(小猪 1 mL/头、中大猪 2 mL/头), 免疫效果并不理想, 猪只得不到很好保护。有些养猪户适当加大免疫剂量, 得到较高的保护率。笔者进行猪口蹄疫免疫程序研究时也发现, 对仔猪进行 1 mL 疫苗接种后, 保护率最高只有 50%; 当免疫剂量为 2 mL 和 2.5 mL 时, 均能产生有效抗体效价, 且两者差异不大。但免疫剂量加大应激反应也加剧。这说明, 接种猪口蹄疫疫苗, 只有最佳的免疫剂量才能产生最佳的免疫效果。疫苗的接种剂量过少, 造成抗原接种量不足, 抗体水平达不到免疫保护的要求,

或者有的厂家生产的疫苗抗原含量不足, 接种后就不能刺激机体产生足够的抗体, 使免疫保护不确实, 造成免疫失败。疫苗的接种剂量过大, 造成免疫麻痹或出现较强的应激反应, 导致机体免疫应答能力降低, 抗体水平也上不去。

1.1.2 疫苗毒株与流行毒株血清型不一致 口蹄疫病毒有 7 个血清型, 我国已发现 O 型、A 型和亚洲 I 型口蹄疫。血清型之间不能交叉保护。在我国, O 型口蹄疫对猪的威胁最大, 国家已实行强制免疫, O 型口蹄疫得到了有效控制。但 A 型口蹄疫病毒在我国已经出现, 猪群受到威胁。如茂名市某猪场接种 O 型疫苗后, 部分生猪出现疑似口蹄疫症状, 后经国家参考实验室确诊为 A 型口蹄疫。

1.1.3 疫苗保管不当 一般情况下, 疫苗从厂家配送到县级疫苗管理单位是很少发生保管不当造成疫苗失效的。但疫苗在基层兽医站或配送到养殖户的过程中往往因保存、运输不当而使疫苗失效。我们在调查中了解到, 有些养猪户领取疫苗后没有用疫苗专用箱加冰袋保存疫苗, 疫苗受太阳照射时间长; 有个别基层兽医站一次领取疫苗过多, 短时间内用不完, 存放时间过长, 或不按疫苗保存条件的要求保存疫苗。这些因素都会降低免疫效果或造成免疫失败。

1.2 免疫程序和操作因素

1.2.1 免疫程序不合理 免疫程序存在缺陷是

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 茂名市科研课题“猪口蹄疫防控研究”(2012B01034)

造成免疫失败的又一原因。养猪户实行一次免疫,难以产生有效保护。一次免疫,无论免疫剂量多少,抗体水平下降速度快,难以产生稳定持久的抗体保护;免疫次数过多,间隔时间过短,造成免疫麻痹,不能产生抗体;间隔时间过长,出现免疫空白期。免疫过的猪群仍然发病,往往是免疫间隔期过长的原因所致。

1.2.2 疫苗接种操作不正确 疫苗开启后不能在2小时内使用完,太阳光照射使疫苗失效;免疫注射时,疫苗外漏造成免疫剂量不足或漏免;追赶猪只等粗暴行为,引起猪恐慌,加剧机体应激反应。

1.3 饲养管理和猪群健康水平

1.3.1 饲养管理不善 营养状况是影响免疫应答的重要因素。当猪的体质虚弱、营养不良、缺乏维生素(如维生素A)及氨基酸时,机体的免疫功能就会下降,影响抗体的产生,降低免疫效果。

几乎所有的霉菌毒素都对猪的免疫系统有破坏作用,使猪机体抵抗力下降,导致猪产生免疫抑制,注射疫苗后抗体水平仍然很低,引起猪群免疫失败。

猪舍恶劣环境条件如高温高湿、低温高湿等,使猪机体抵抗力下降,降低免疫效果。

1.3.2 猪群健康水平低下 健康的猪群免疫后能产生坚强的免疫力,而体质虚弱、营养不良,患有慢性疾病和免疫抑制性疾病如圆环病毒病,或处于应激状态的猪群,产生免疫应答的能力都较差,往往会造成免疫失效。

2 对策和建议

2.1 提高疫苗质量,确保免疫密度

2.1.1 建议生产厂家提高疫苗产品质量,确保其安全性和抗原含量的有效性。

2.1.2 疫苗保管实行专人管理,完善入库、出库管理制度,建立台账,定期清理失效疫苗,按国家要求处理,防止流入市场。

2.1.3 按猪口蹄疫疫苗保存和运输条件的要求在2~8℃条件下贮藏,不能低于0℃,更不能将疫苗放入急冻室。养猪户领取疫苗后用疫苗专用箱加冰袋保存疫苗,避免太阳光照射。对于冻结、分层、破乳的灭活疫苗禁止使用。

2.1.4 坚持免疫接种策略,确保免疫密度。疫苗免

疫是预防和控制口蹄疫的有效手段,必须坚持强制免疫,确保免疫密度;适当加大免疫剂量,尤其是当地发生疫情时适当加大免疫剂量尤为重要。

2.1.5 加强口蹄疫监测。选择与当地流行毒株相匹配的疫苗毒株进行免疫接种,提高免疫针对性,确保免疫的有效性。

2.2 科学的程序免疫

2.2.1 免疫程序涉及的因素是多方面的,如母源抗体水平、疫苗抗原的免疫性、疫苗抗原含量、免疫次数、接种动物的反应性等。首先应该考虑当地口蹄疫流行情况;其次结合本场实际开展抗体水平监测,根据抗体水平确定首免时间、基础免疫次数及剂量。根据猪口蹄疫流行特点,预防猪口蹄疫要抓好春秋两个季节的普防。每年春初和秋末各加强免疫一次,各间隔3~4周再次免疫一次。

2.2.2 疫苗开启后要在2小时内使用完,避免太阳光照射;免疫注射时,2~4周龄猪应使用2.5cm长的16号针,耳后肌肉注射,避免疫苗外漏或漏免,发现漏免猪只及时进行补免;应选在清晨或者傍晚进行免疫注射;切忌追赶猪只等粗暴行为,避免人为应激因素的产生。

2.3 提高猪群健康水平

加强猪群的饲养管理,确保饲料营养的全价性,提高猪群的免疫力;保持合理的饲养密度、舒适的环境温度和湿度、良好的通风,为猪群创造一个舒适环境;消除霉菌毒素、圆环病毒病等免疫抑制性因素的影响;免疫前应了解猪群的健康状况,凡有病、瘦弱、临产母猪(30天内)不应接种,待病猪康复,母猪产后再按规定补免。

2.4 加强综合防控措施

2.4.1 加强消毒 笔者在调查中发现,几乎所有养猪专业户平时对猪场不进行消毒,即便发生疫情也很少消毒,这样增加了防控猪口蹄的难度。口蹄疫病毒对酸碱特别敏感,当pH小于4和大于9时,可被迅速灭活。在自然条件下,该病毒多因高温及强烈的阳光照射而失活,这是口蹄疫在夏季少发病的原因。对于口蹄疫的防控,绝不能仅仅依靠疫苗免疫这一手段。笔者认为,在目前的条件下,合理接种疫苗和加强消毒是降低本病威胁最

为可靠的手段。消毒液要确保有效消毒浓度,定期更换消毒液。

2.4.2 加大防控宣传力度 猪口蹄疫病毒传播途径广泛,甚至空气流动都可能传播。对于口蹄疫这类烈性传染病的防控,依靠单个农户和饲养场的力量是相当有限的,非举全国之力难以有效控制。因此,防控猪口蹄疫,必须加大防控的宣传力

度,使口蹄疫对养殖业的危害性、口蹄疫的流行特点和症状、口蹄疫防控的措施和方法等知识深入人心,充分调动全社会的积极性,共同防控猪口蹄疫。一旦发生疫情,除了扑杀病畜和染毒动物、封锁疫区外,要及时公开信息,使受威胁的地区采取应急综合防控措施,有针对性地做好紧急免疫接种工作。



(上接第 49 页)

设计与建造等均可用多媒体或视频教学,鲜活生动的画面大大提高了教学效率和学生学习的积极性。

4.3 对专业师资配置及任职要求的建议

建设高素质的师资队伍是完成人才培养目标的关键和根本。要培养高质量的人才,就需要有高质量的教师,就必须加强师资队伍建设。中等职业学校畜牧兽医专业师资队伍建设任重而道远。要造就一支师德高尚、业务精湛、结构合理、无私奉献的师资队伍必须做好以下四个方面:一要加强师德师风建设;二要不断提高教师的业务水平;三要以“双师型”教师为重点,努力提高教师本身的实践能力,专业理论课教师中具有“双师型”比例达 70%以上,专任教师中独立制作、运用课件比例达 60%以上;四要进一步加强对青年教师的教育提升培养,青年教师精力充沛,知识面广,但教学经验稍差,可通过下企业锻炼、向老教师学习、自学或深造等方式加以培养,并委以重任,使之尽快成为骨干教师和学科带头人。

4.4 生产性实习实训基地建设与实践教学建议

加强实训、实习基地建设是彰显办学特色、提高教学质量的重点,而产学研结合是一条最佳途径。产学研合作教学模式就是学校与生产第一线的企业合作培养学生的一种人才培养模式。它是以教学模式、教学内容、教学方法改革为重点,以培养学生的职业能力、职业素质和增强学生的

就业竞争力为主线,按照现代企业对人才的要求,充分利用学校和企业两种不同的教育环境和教学资源,发挥学校和企业人才培养方面各自的优势。采取课堂教学与岗位实践相结合,通过强化实践教学环节来培养满足行业、企业所需要的高技能应用型人才的新型教学模式。具体途径一是创新校内实训基地建设模式;二是加强校外实训基地建设。

4.5 考试形式的改革创新

以前各门课程均采用单一的闭卷形式考试,以百分制来进行成绩的评定,影响了学生全面能力的提高。要按课程性质和特点,灵活运用笔试(开卷和闭卷)、口试、技能操作、写小论文或小综述等多种考核方式,鼓励多种考核方式联合运用进行考核。对专业基本能力课程和岗位核心能力课程可实行严格的闭卷考试,专业能力拓展课程和人文素质拓展课程可采用开卷考试、口试、小论文或小综述形式进行考核。

参考文献:

- [1] 蒋离生,潘基桂,梁炜,等. 中职畜牧兽医专业职业岗位能力调查与分析[J]. 广西农学报, 2009, 24(5): 81-84.
- [2] 霍顺校. 中等职业学校畜牧兽医专业发展面临的困境及对策[J]. 河北农业大学学报(农林教育版), 2010, 12(3): 370-373.
- [3] 蒋离生,梁桂,张春红,等. 中等职业畜牧兽医专业毕业生就业调查[J]. 广西农学报, 2008, 23(6): 86-90.
- [4] 陈荣光. 中专畜牧兽医专业课程改革研究[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(3): 115-117.