

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编:蒋宗勇

副 主 编:孙彦伟

责任编辑:孙彦伟 岑俏梅

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明

曾振灵 毕英佐 王贵平 舒鼎铭

孙彦伟 蔡建平 王政富 刘彩霞

特邀编委:

陈 峰 陈大毅 黄小建 陈小云

郑庆禄 贺湘仁 李 岩 林旭桢

陈瑞爱

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:2月5日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

目 录

·专题综述·

- 胚胎干细胞体外诱导分化的研究进展.....熊 浩, 崔 雯(3)
- 泌乳母猪的能量需要及营养策略.....孙利娜, 谷子林, 等(7)

·畜牧技术·

- 仙湖肉鸭 A 系种蛋重与蛋形指数对孵化效果的影响.....吕敏芝, 董广强, 等(10)
- 酶制剂对肉鸭生产性能的影响研究.....汪前红, 李俊波, 等(13)
- 狮头鹅人工授精技术及其应用研究.....马江耀, 陈进胜, 等(16)
- 马岗鹅繁殖性能低下的原因分析及解决办法.....岑兴洪, 钟建桥(19)

·兽医临床·

- 广东地区鸡毒支原体血清学调查.....孔意端, 陈 峰, 等(21)
- 猪链球菌病的组织病理学研究.....李小杉, 杨丰利, 等(24)
- 奶牛急性胃肠炎的诊治.....刘瑞鑫, 黄 道, 等(27)

·试验研究·

- 猪轮状病毒 GD1 株 VP7 基因的克隆及序列分析.....田小艳, 孙 华, 等(29)
- 猪繁殖与呼吸综合征病毒河北地方株 ORF3 基因的克隆及变异分析.....王 娇, 赵泽坤, 等(32)
- 四味健蚕增茧液中白头翁的薄层鉴别.....何绮霞, 曾 德, 等(35)
- 岗梅根醇提液对小鼠的半数致死量(LD50)的测定.....罗雅劲, 孙永学, 等(37)
- 昆明小鼠内细胞团和滋养层细胞注入去核 2-细胞胚的核移植研究.....彭礼繁, 赵 焕(40)

·宠物园地·

- 犬埃里希氏体病的诊治.....张志宏, 李万荣, 等(43)
- 影响犬骨折愈合的因素.....刘 鹏(44)

·经验交流·

- 全自动尿囊液收获机的改进.....麦康聪, 梁雄新, 等(46)
- 一例山羊败血性链球菌病的诊断与综合防治.....陈绍俊(49)
- 广西藤县推行畜禽免疫补针日试点工作初探.....覃远天(51)

·信息之窗·

- 2009“永顺杯”优秀论文评选结果.....(中一)
- 欢迎订阅本刊.....(18)
- 2010“永顺杯”优秀论文评选启事.....(49)
- 中国诞生了执业兽医.....(39)
- 中国如何使疫苗免疫达到最佳效果.....(52)

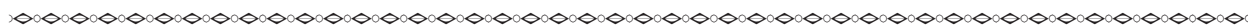
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Jan.2010 Volume 35,Number 1 (Total No.149)

Main Content

- Research progress on differentiation of embryonic stem cell in vitro
.....Xiong Hao, Cui Wen(3)
- Energy requirements of lactating sows and nutrition strategiesSun Lina, Gu Zilin, et al(7)
- The influence of weight of breeding egg and egg form coefficient on hatching in Xianhu meat duck A
..... Lv Minzhi, Dong Guangqiang, et al (10)
- Influence of enzyme preparation on production performance in meat ducks.....
.....Wang Qianhong, Li Junbo, et al(13)
- Artificial fecundation of Shitou goose and its application Ma Jiangyao, Chen Jinsheng, et al (16)
- Problems caused low reproductive performance in Magang geese and countermeasures to it
..... Cen Xinghong, Zhong Jianqiao(19)
- Serological investigation of mycoplasma gallisepticum in Guangdong province.....
.....Kong Yirui, Chen Feng, et al(21)
- Histopathological study of Streptococcus Suis disease..... Li Xiaoshan, Yang Fengli, et al(24)
- Clone and sequence analysis of VP7 gene of porcine rotavirus strain GD1... Tian Xiaoyan, Sun Hua, et al(29)
- Clone and variation analysis of ORF3 gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus strain
TS isolated from Hebei province.....Wang Jiao, Zhao Zekun,et al(32)
- Thin layer chromatography of radix pulsatillae in SiweijiancenzengjianyeHe Qixia, Zeng De, et al(35)
- LD50 of Gangmeigenchun extract in mice.....Luo Yajin, Sun Yongxue, et al (37)
- Nuclear transplantation of mouse inner cell mass and trophectoderm cells into enucleated two-cell
embryos.....Peng Lifan, Zhao Huan (40)
- Diagnosis and treatment of canine ehrlichiosis..... Zhang Zhihong, Li Wanrong, et al(43)
- Factors influenced healing of canine bone fractureLiu Peng(44)
- Improvement on automatic allantoic fluid harvester Mai Kangcong, Liang Xiongxin, et al(46)



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

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

Chief Editor: JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor: SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel: (020)37245052 37288167

Fax: (020)37245052

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

胚胎干细胞体外诱导分化的研究进展

熊浩, 崔雯

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)是从附植前胚胎的内细胞团(ICM)或附植后胎儿的原始生殖细胞(PGCs)经体外抑制分化培养、分离和克隆得到的具有发育全能性的细胞。ES 细胞体外诱导分化的研究自从 20 世纪 90 年代开始到现在,一直是生命科学和医药工程领域的研究热点,并且近年来这方面的研究也取得了一些突破性的进展。本文简述了胚胎干细胞的诱导原理、方法和定向分化的一些细胞种类以及目前研究存在的问题和困难。

关键词: 胚胎干细胞; 诱导; 分化

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0003-03

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞)具有高度的分化潜能,1981 年 Evans 和 Kauffman^[1]最早报道了由延迟着床小鼠囊胚成功分离到 ES 细胞。由于来源于 ES 细胞的各种细胞可能应用于临床,为器官移植、损伤器官的修复提供原材料,所以人们除了研究 ES 细胞的分离、克隆和培养之外,更重要的是研究其在体外诱导分化的机制、条件以及由其分化的细胞种类。ES 细胞在体外的培养过程中,能够在有饲养层细胞或者分化抑制因子(DIA),白血病抑制因子(LIF)等存在的条件下维持其未分化状态,保持发育全能性,可以无限增值,但一旦除去饲养层细胞,除去这些抑制分化因子,或者添加一些诱导分化因子(如维甲酸 RA、神经生长因子 NGF)等,就会向各类可能的细胞发生定向分化。在 ES 细胞的诱导过程中,不同的诱导方式所得到的分化细胞的种类和数量不同;相同的诱导方式,不同的培养状态其分化行为也不相同。目前,已从 ES 细胞诱导出神经细胞、心肌细胞、血细胞、血管细胞、脂肪细胞、肝细胞、骨细胞和胰岛素分泌细胞等。

1 体外诱导 ES 细胞的原理

在体胚胎分化过程中,组织发生和身体构造的形成具有时空顺序性和相互诱导性。在个体发育过程中,细胞分化是程序控制的有序有规律过程,程序的运行结果表现为不同发育阶段、不同组织部位的细胞表现出不同的形态、不同的生长方式和不同的生理功能。从分子水平上来看,这一结

果取决于细胞在基因表达上的时空差异。这种基因表达差异除由细胞内在发育程序决定外,还受细胞外环境影响和调控,且有时这种外部控制条件或环境对形成特定细胞有着决定性作用。ES 细胞体外定向诱导分化的原理,就是选择适当的诱导剂和诱导模式,通过诱导物与细胞表面受体结合或使细胞发生轻度可逆性损伤等,使被诱导细胞按预定的细胞类型方向分化^[2],然后将这些定向分化的细胞进行分离和培养传代,从而得到人们所需要的细胞类型。

2 体外诱导 ES 细胞的方法

体外诱导 ES 细胞的常用方法是将 ES 细胞进行悬浮培养或悬滴培养,使其形成类胚体(Embryoid Bodies, EBs),该结构的分化过程与体内胚胎的早期发育过程相似。首先将 EBs 消化成单细胞,然后再贴壁培养,并于不同的培养阶段添加不同种类和不同浓度的化学物质、条件培养基或细胞因子等诱导条件,直接促进 ES 细胞定向分化为某种特殊类型的细胞;或通过改变培养条件对某些类型的细胞分化起抑制作用,从而高效诱导目的细胞的分化^[3]。改变细胞的培养条件使 ES 细胞进行定向分化的基本策略有三种:一是向培养基中添加生长因子和化学诱导剂等;二是将 ES 细胞与其它细胞一起进行培养;三是将细胞接种在适当的底物上,以促使细胞中某些特定基因的表达上调或下降,从而引发细胞沿着某一特定谱系进行分化。体外诱导胚胎干细胞的物质有化学试剂诱

导法、细胞因子诱导法和外源基因诱导法。

2.1 化学试剂诱导 一些化学试剂加入到 ES 细胞中与其共培养后, 会使得 ES 细胞发生定向分化, 因此有时用相关化学试剂对 ES 细胞进行定向诱导分化。例如视黄酸(又称维甲酸, RA)就是一种强烈的分化诱导剂。20 世纪初, 人们仅仅认识到维生素 A (VA) 是一种重要的营养物质, 特别在视循环中发挥着重要生理作用, 妊娠期 VA 缺乏有可能导致胎儿畸形。后来发现在胚胎发育过程中, RA 沿胚轴形成浓度梯度, 影响胚胎背部和四肢的形成, 从而推测其对胚胎发育起重要的激素样调节作用^[4]。维甲酸是体外诱导 ES 细胞定向分化的常用因子。一般认为维甲酸进入细胞后, 首先与细胞质中 CRABP (cellular RA binding protein) 形成复合物, 然后复合物进入核内, 维甲酸与染色体上的受体结合, 从而调控一系列基因的表达, 使细胞的表型发生转变。而 Forester 的实验结果表明, 维甲酸不但能拮抗 DIA 对 ES 细胞的分化抑制作用(这提示有共同作用环节存在的可能), 而且也可影响分化程序和方向的选择。除了视黄酸之外, 还有维生素 C (VC)、维生素 K₃ (VK₃)、过氧化氢、β-磷酸甘油、地塞米松和 2,5-羟基维生素 D₃, 二甲基亚砷 (DMSO) 等化学试剂也能诱导胚胎干细胞定向分化成为一些特种类型细胞。

2.2 细胞因子诱导 细胞因子能显著改变 ES 细胞的发育途径。ES-D3 细胞与骨髓基质细胞 RPO. 10 共培养时, 单独添加重组白细胞介素 -6 (rIL-6) 可诱导 ES 细胞分化为 F4/80⁺ 星形巨噬细胞和成纤维细胞, 不形成 Thy-1⁺、B-220⁺、Joro75⁺ 淋巴祖细胞^[5]。SCF、TPO 和胚胎条件培养液协同作用可诱导 ES 细胞分化为造血干 / 祖细胞; 神经生长因子 (NGF) 可促进 EBs 中神经元样细胞的形成, 成纤维细胞生长因子 -2 (FGF2) 能使 ES 细胞分化的神经祖细胞进一步分化为功能性神经元; FGF2、EGF、血小板源生长因子 (PDGF) 与神经前体细胞条件培养基可协同诱导 ES 细胞分化为寡树突胶质细胞; 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 可抑制造血细胞发育和诱导巨噬细胞分化; 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 则使 ES 细胞分化为树状细胞 (DC), 且经 IL-4、肿瘤坏死因子 -α (TNF-α) 和 ant-CD40mAb (LPS) 刺激后可转化为成熟的树状细胞^[6]。

2.3 外源基因诱导 ES 细胞的定向分化 导入

外源性基因也可使 ES 细胞发生定向分化。若把在特定发育阶段中起决定作用的基因导入 ES 细胞基因组中, 将会使细胞准确地分化为某一特定类型的细胞。但在应用这一方法时, 首先必须确定决定细胞向不同方向分化的关键基因, 其次还要保证在适当的时候将该基因导入 ES 细胞基因组的正确位置上。目前已经有报道表明用这种方法可使 ES 细胞定向分化为神经细胞、肌细胞、胰腺细胞等。

3 体外诱导的主要细胞类型

ES 细胞可以体外诱导分化为多种细胞类型。

3.1 成骨细胞 成骨细胞的主要功能是合成、分泌骨基质并促进基质矿化形成骨组织, 细胞内碱性磷酸酶 (AKP) 含量较高, 分泌 I 型胶原、骨结合素、骨钙素、纤粘连蛋白和多种细胞因子等。研究表明, ES 细胞可作为骨组织工程种子细胞的来源, 可采用在培养基中添加不同的化学物质, 或与特殊细胞或组织共培养的方法诱导分化 ES 细胞, 这些物质包括 1, 25 (OH)₂VD₃、地塞米松、全反式维甲酸、维生素 C 和 β-磷酸甘油 (β-glycerophosphate, β-GP) 等。

Buttery 将小鼠 ES 细胞悬浮培养形成 EBs, 用胰酶离散成单细胞, 并于 α-MEM 培养基中添加维生素 C (VC)、β-磷酸甘油和地塞米松或视黄酸 (RA) 诱导分化, 或与小鼠胎儿成纤维细胞共培养。研究结果表明, 地塞米松协同维生素 C 和 β-磷酸甘油都可最大量诱导骨结节的形成, 且这种诱导作用具有时间依赖性^[7]。Zur Nieden 报道 VC、β-磷酸甘油和 1, 25 (OH)₂VD₃ 可诱导 ES 细胞分化为矿化的成骨细胞。诱导分化培养约 12 d 时, 培养物的 AKP 活性增加并出现早期成骨细胞标志, 组织化学染色可见明显的矿化细胞, 免疫荧光显示存在骨基质和骨钙素等非胶原化合物。应用实时定量 PCR 对骨特化基因的表达进行分析, 结果表明, ES 细胞诱导分化的第 4 周即可检测到骨钙素和骨涎蛋白 (BSP, 成骨细胞分化终末阶段的特征, 即此时存在“成熟”的成骨细胞^[8]。孙亚东等^[9]在诱导时在加入 1, 25 (OH)₂VD₃ 后成骨细胞矿化明显增强, 认为是该激素和成骨细胞分泌的细胞因子协同促进 EBs 分化的结果。

3.2 造血细胞 小鼠的胚胎干细胞分阶段培养或直接放置于饲养层上可以分化为各种造血细胞, 包

括红系、粒单系、巨核系、肥大细胞以及淋巴系细胞。已经有报道表明,ES 细胞可分化为造血系谱系的大多数细胞,如造血祖细胞、红细胞、巨核细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、T- 淋巴祖细胞和 T- 淋巴细胞、B- 淋巴祖细胞及 B- 淋巴细胞等。

徐令等^[10]改用小鼠胚胎干细胞体外诱导,发现分阶段培养时,在其发育的不同阶段使用不同的微环境,可使胚胎干细胞高效地向造血干/祖细胞分化,造血干/祖细胞表面标志 CD34 阳性细胞的比率可达 86%,并且参照小鼠的研究结果,分阶段诱导人的胚胎细胞发育,结果发现,从人受精卵桑葚胚分离来的人的胚胎细胞在一定条件下可以发育为胚胎体,并可进一步向造血细胞分化,其所需时间较小鼠的长。Nakano 等^[11]报道,在无外源因子的条件下,ES-D3 细胞与骨髓基质 OP9 细胞(一种 M-CSF 基因突变型细胞系,不表达功能性 M-CSF)共培养,第 5 d 时即出现分化的造血祖细胞,以后逐渐形成特化的造血系细胞,第 14 d 时 90% 以上的 ES 细胞分化为嗜中性粒细胞、巨噬细胞、红细胞、浆细胞、巨核细胞和 B- 淋巴细胞;添加 200 ng/mL 的 M-CSF 后,第 5 d 时分化细胞的克隆数急剧减少,第 10 d 时几乎检测不到分化的造血细胞,而巨噬细胞的数量剧增。在增殖的细胞总数中,约 90% 为巨噬细胞,非巨噬细胞减少近 50%,由此说明 M-CSF 具有抑制造血细胞发育和诱导巨噬细胞分化的作用。Palacios 等^[12]将 ES 细胞置于含 IL-3、IL-6 和 RPO. 10 的饲养层细胞上培养,并加入培养 FLS4. 1 胎肝饲养层细胞系的上清液,培养 5~7 d 后,将此诱导的细胞输注入已经致死量照射的受体小鼠,于 15~20 d 后检测,胚胎干细胞诱导分化的细胞能重建致死量照射受体鼠淋巴、髓系和红系的造血功能。

3.3 神经细胞 ES 细胞诱导成为神经细胞的研究在最近几年发展很快,为人们研究神经细胞的谱系发生和神经细胞分化过程中生长因子的作用等提供了良好的体外模型。利用 ES 细胞体外分化模型还可以为细胞移植提供大量材料。例如由小鼠 ES 细胞分化形成的神经胶质细胞向大鼠中的移植已获得了初步成功,预示着利用人的 ES 细胞进行细胞移植和基因治疗将有一个美好的前景。

关于 ES 细胞分化神经细胞的报道较多。1995 年,Bain 等^[13]报道了利用 ES 细胞诱导分化产生

大量神经元细胞的过程。利用悬浮培养和 RA 诱导相结合的方法,通过形态学、免疫学、电生理学、分子生物学等多种手段的检测,证明从 ES 细胞可诱导出成熟的神经元细胞和神经胶质细胞。Strubing 等^[14]也有过相关报道。Ge 等^[15]曾经应用 BRL-CM 培养 ES-D3 细胞,添加 AR 诱导 ES 细胞分化,并用阿糖胞甙(Ara-C)抑制其增殖。在添加 RA 后的第 1 d 出现散在的神经元样细胞,添加 RA 后的第 2 d 和添加 Ara-C 后的第 1 d 出现大量神经元样细胞,并形成网状结构。RA 和 Ara-C 联合应用可诱导 ES 细胞分化为神经元样细胞。在国内,徐洁(1991)、唐仕波(2000)、吴旋(2001)、杨智宽(2002)、韩嵘等(2002)等都有过关于从 ES 细胞中成功诱导分离得到成骨细胞的报道。

3.4 胰岛细胞 胰岛由内分泌部和外分泌部组成,内分泌部(胰岛)由郎格罕氏细胞与合成肽类激素的 α 细胞(胰高血糖素)、 β 细胞(胰岛素)、 δ 细胞(抑生长素)和 pp 细胞(胰腺多肽)组成。在胚胎发生过程中,胰腺是由靠近脊索处结构发育完全的内胚层单细胞层形成。

Assady 等^[16]报道,应用体外贴壁和悬浮培养使人 ES 细胞自主分化为功能性 β 细胞,培养基中胰岛素(Ins)的分泌具有细胞分化依赖性。Blyszczuk 等^[17]过度表达 Pax4 的 ES-R1 细胞,其 *isl-1*、*ngn3*、*Ins*、胰岛淀粉多肽和 *Glut-2* 的 mRNA 水平明显提高,*nestin*⁺ 细胞的数量也明显增加,葡萄糖刺激均可引起 Pax4⁺ 细胞和野生型 ES 源细胞释放胰岛素。将这些细胞移植到链脲菌素处理的糖尿病小鼠体内,可使血糖水平恢复正常。筛选基本表达 Pax4 和 *nestin*⁺ 细胞并进行组织型培养,可获得含 Ins⁺ 颗粒的胰岛样球状结构,即典型的胚胎或成年 β 细胞。

总的来说,目前由 ES 细胞诱导成胰岛细胞的研究还只是初见端倪。

3.5 其它类型的细胞 ES 细胞还可以诱导成包括肝细胞、神经胶质细胞、肌肉细胞、内皮细胞、黑色素细胞、淋巴细胞、脂肪细胞和成纤维细胞等,国内外都曾有过报道。

4 应用前景和相关问题

由于 ES 细胞具有体胚胎所不具有的优越性,所以 ES 细胞是研究胚胎发育的理想模型。ES 细胞几乎可发育成所有类型细胞,可将定向诱导产

生的细胞或组织用于替代治疗解决相应的严重疾病,如神经变性疾病(帕金森综合症、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默病等),糖尿病,心脏病,原发性缺陷病,烧伤等,但是目前也存在不少问题:

4.1 定向分化的条件仍未完全清楚 目前虽然从胚胎干细胞定向分离到多种其它细胞,但是诱导条件还不十分清楚,例如诱导物的作用浓度和时间并未有准确的报道,致使ES细胞定向分化的基因和一些细胞因子也不明确,还有饲养层细胞等杂细胞也对诱导分化有影响,这些因素都是不确定的,需要进一步的研究和探索。即使定向诱导成功,将这些特殊类型细胞从未分化的胚胎干细胞和饲养层细胞中分离和纯化出来也存在操作上的困难。

4.2 定向分化细胞真正用于移植还存在困难 ES细胞能定向诱导成特定细胞及简单组织,甚至可以最终培养成器官,但是要使其成为一个完整的器官尤其像心脏,肝,胰腺等复杂结构的器官并移植到人体内,还存在操作上的困难。还有,这些来源于分化细胞的外来器官在用于移植时也会与体内传统器官存在不同程度的排斥反应,如何克制排斥也是目前的一大难题。由于ES细胞涉及到的伦理、社会、法律和道德等问题也引起了人们的重视。

ES细胞被定向诱导分化为各种具有特殊功能的细胞培养体系的建立,使人们对正常生物体发育过程中所发生的复杂事件、异常的细胞特化和细胞分裂有更加深刻的认识,诱导分化的特殊类型的细胞将为细胞治疗和组织治疗,甚至器官移植提供新的来源。虽然目前ES细胞定向诱导分化的细胞类型的应用存在的难题较多,但是我们相信随着科学技术突飞猛进的发展,这些难题将会得到有效的解决。将来一旦人们在体外能够完全控制ES细胞定向分化和解决器官移植的难题,那必将引发一场新的生物学革命,人类完美修复或替代因遗传以及后天疾病引起的重要组织、器官的缺陷及损伤的梦想将得以实现。

参考文献:

- [1] Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos[J]. Nature, 1981, (292):154-156.
- [2] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001. 904-906.
- [3] 宋晓平. 小鼠胚胎干细胞定向诱导分化成骨细胞研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2003. 34-35.
- [4] Morriss-Kay G M, Sokolova N. Embryonic development and pattern formation[J]. FASEB, 1996, (10):961-968.
- [5] Gutierrez-Ramos J C, Palacios R. In vitro differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, (89):171-175.
- [6] Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. Blood, 2003, 101(9): 3501-3508.
- [7] Buttery L D, Bourne S, Xynos J D, et al. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells[J]. Tissue Eng, 2001, 7(1):89-99.
- [8] Zur Nieden N I, Kempka G, Ahr H J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts[J]. Differentiation. 2003, 71(1):18-27.
- [9] 孙亚东, 杨学义, 李锋涛, 等. $1, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 诱导小鼠胚胎干细胞向成骨细胞分化的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, (9):1117-1120.
- [10] 徐令, 乔春平, 黄绍良, 等. 体外定向诱导胚胎干细胞为造血细胞[J]. 科学通报, 2000, 45(8):815-820.
- [11] Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture[J]. Science, 1994, (265):1098-1101.
- [12] Palacios R, Golunski E, Samaridis J, et al. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(16):7530-7534.
- [13] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro[J]. Dev Biol, 1995, 168(2):342-357.
- [14] Strubing C, Ahnert Hilger G, Shan J, et al. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells into the Neuronal lineage in Vitro Gives Rise to Mature Inhibitory and Excitatory Neurons[J]. Mech Dev, 1995, (53):275-287.
- [15] Ge J, Guo Y, Wang Z, et al. Preliminary study on in vitro induced differentiation of embryonic stem cells into neurons[J]. Yan Ke Xue Bao, 2000, 16(1): 1-6.
- [16] Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells[J]. Diabetes, 2001, 50(8): 1691-1697.
- [17] Blyszczek P, Czyz J, Kania G, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(3):998-1003.

泌乳母猪的能量需要及营养策略

孙利娜¹, 谷子林², 李素敏¹, 刘亚娟²

1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省山区研究所, 河北 保定 071001

摘要: 本文阐述了泌乳母猪的能量需要, 并针对泌乳母猪生产中存在的问题, 从能量需要入手, 通过合理的营养措施, 充分发挥母猪生产潜能, 提高养猪经济效益。

关键词: 泌乳母猪; 能量需要; 营养策略

中图分类号: S828.8⁹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0007-03

母猪的营养是影响繁殖效率的重要因素。它不仅影响母猪的产仔数, 而且影响仔猪的生产性能, 尤其是断奶体重和成活率。能量作为猪饲料中重要的营养成分, 决定猪的采食量, 日粮的营养浓度, 也是影响母猪生产性能的重要因素^[1]。保证日粮适宜的能量水平, 是发挥母猪繁殖潜力, 提高泌乳量和乳品质, 获得仔猪最大窝增重的关键; 对减少母猪泌乳期失重, 缩短繁殖周期, 提高养猪业的经济效益具有十分重要的意义^[2]。为此, 本文从泌乳母猪能量需要入手, 针对当前泌乳母猪生产中存在的问题, 探讨相关对策。

1 泌乳母猪能量需要

随着现代养殖技术的发展, 母猪的泌乳量得到很大提高, 母猪的平均泌乳量已由过去的 5~7 kg/d 上升到 10 kg/d。因此, 过去推荐的营养需要已很难满足现代母猪的营养需求。通常泌乳母猪的能量摄入量取决于母猪的自身体况、产乳量和乳组分以及体重和体组成的变化。NRC 推荐的泌乳母猪的维持消化能的需要量为 110 kcal ME/kgBW^{0.75}。Noblet 等^[3]认为, 哺乳期母猪维持的能量需要量比怀孕期多 5%~10%, 即哺乳母猪的维持代谢能为 114 kcal/kgBW^{0.75}, 妊娠母猪的维持代谢能约为 100 kcal/kgBW^{0.75}。每生产 1 kg 猪奶需要代谢能为 100 kcal/kgBW^{0.75}。研究证实, 泌乳的能量需要量包括维持以及泌乳的能量需要量, 体重 120 kg 的母猪, 每日维持所需 DE 为 3301~3397 kcal, 以供产乳时所需的能量水平。Neil^[4]报道, 泌乳母猪的维持能量需要量约为 105 kcal ME/kgBW^{0.75}, 假设猪乳含有 1200~1300

kcal/kg, 能量利用率为 65%, 那么生产 1 kg 猪乳要消耗 1800~2000 kcal DE。

近年来, 部分国家泌乳母猪的能量标准是根据母乳仔数来确定的, 部分国家是根据母猪体重、泌乳持续期和泌乳量水平确定。在母猪泌乳期内给予高能量水平的饲料, 可提高泌乳量 25.7%~44.2%, 同时亦可提高哺乳仔猪生长速度, 使母猪营养处于良好状态, 缩短空怀期。

2 采食量不足是泌乳母猪饲养中存在的主要问题

母猪生产是整个养猪生产中的关键环节, 泌乳母猪的采食量低, 泌乳期间母猪的失重、仔猪的成活率低和断奶窝重小、世代间隔长等诸多问题, 直接制约着养猪业的发展。其中, 泌乳母猪的采食量低下导致母猪的失重, 是当前养猪生产中存在的最大难题, 也是引起母猪生产上其他问题的关键。

很多因素如遗传、日粮质量、日粮组成以及环境都影响哺乳母猪的采食量^[5]。饲料能量的供给对母猪的采食量影响很大。泌乳期间的总采食量与母猪的泌乳性能及随后的繁殖性能呈正相关。哺乳母猪每天需要的能量几乎 75% 用于泌乳。当母猪的采食量低或日粮的必需养分、能量或蛋白质的缺乏或不能满足其需要时, 母猪便动员和消耗自身的脂肪和肌肉组织, 以满足其泌乳的营养需要。长期的营养摄入不足, 导致了母猪掉膘或体重的下降。过度掉膘不仅影响哺乳仔猪的增重速度还会严重影响母猪下一胎的生产性能, 使断奶到再发情的时间延长, 受孕率下降, 产仔数和仔猪

初生重下降^[6]。因此,满足母猪泌乳期的营养需要,保证其较好的采食量,是保持母猪良好体况和最佳繁殖性能的基础。

3 提高泌乳母猪繁殖率的营养策略

能量营养在母猪生产中发挥着十分重要的作用。母猪产仔数随着科学研究的深入而提高,泌乳性能将随着提高。生产性能的提高,必然要求饲料的营养浓度,特别是能量一定要适宜生产性能的需要。因此,搞好泌乳母猪能量营养,对提高母猪的繁殖率具有重要意义。

3.1 提高饲料的能量浓度,最大限度满足母猪的营养需要 能量是泌乳母猪日粮中最难满足的日粮因素。大多数情况下,泌乳母猪很难采食足够的饲料来满足它们每日的能量需要。在这种情况下,泌乳母猪由于有产奶作为强大的动力,将消耗母体组织以满足必然的能量需要。当能量采食量增加时,泌乳期体重损失下降,可缩短断奶后发情的时间。可见,泌乳期营养素的进食量对断奶后繁殖性能有深远影响。泌乳期低能量或蛋白质进食量与体组织损失增加和断奶后返情推迟有关^[6]。提高日粮的能量浓度和(或)总耗料量,可使能量进食量达到最大,可有效避免母猪在泌乳期的失重,保证泌乳母猪较好的繁殖性能。周虚^[7]报道,泌乳期的饲养策略是最大地提高摄食量,最大限度的满足其能量需求^[8],泌乳期营养不足也会导致母猪体重下降加大,断奶后发情延迟,下一窝产仔数减少。泌乳期第3周摄食量增加1 kg,下一窝产仔数增加0.5头。

3.2 合理的添加脂肪,提高日粮的能量水平 为了尽可能的满足泌乳母猪对高能量摄入的要求,其营养管理措施是在配方中选用高能量原料,最好是油脂。油脂除具有高能量这一优点外,还具有低代谢热,减少应激,提高仔猪成活率的优点。体脂肪在体内转化为乳脂肪的效率为80%~85%。Pettigrew等^[9]报道,添加脂肪使得饲料的能量浓度提高,从而减少自由采食,增加能量摄入量,并能有效控制母猪在哺乳期的体脂肪损失和有效提高仔猪断奶窝重。生产实践证明,保证充足的能量营养,可保持母体良好的体脂储备,有效的缩短发情间隔,提高母猪的繁殖效率。在生产中,哺乳母猪日粮中的适宜脂肪添加量为3%~5%,对母猪繁殖性能没有影响。

3.3 注意能量与蛋白质的互作,充分发挥日粮组合优势 能量与蛋白,或更准确地说是氨基酸,是除水以外的两个最大量的必需日粮要素。因此,这两类日粮要素一直是哺乳母猪营养研究的焦点,在保证泌乳母猪日粮高能量供给的前提下,一定要考虑能量与蛋白质等其它营养物质之间的互作、只有这样,才能发挥泌乳母猪最佳的繁殖性能^[10]。研究结果表明,哺乳母猪肌肉和其它组织的体蛋白是氨基酸和能量的重要来源,不能单独考虑日粮中的能量和氨基酸。美国 Minnesota 大学对初产母猪的试验结果表明,在能量摄入量相对较高时,为达到最大泌乳量,每日赖氨酸需要量为459 g或更多,而在低能量摄入量时,每日赖氨酸需要量仅为279 g。因此,在进行泌乳母猪饲料配方设计时,综合考虑能量与其他营养物质之间的平衡和互作,合理地搭配日粮,充分发挥日粮的正组合效应,以满足母猪的营养需要,保证最佳的繁殖效率。

3.4 注意母猪日粮氨基酸的营养和互作 现代繁育技术已使哺乳母猪的泌乳性能得到很大提高,同时也对现代高产哺乳母猪的氨基酸营养提出了新的要求,赖氨酸、支链氨基酸等具有特殊的生理意义。赖氨酸是泌乳母猪最重要的氨基酸,在妊娠期和泌乳期增加母猪的赖氨酸摄入量明显改善仔猪生长;提高了母猪泌乳量,减少母猪的体重损失。此外,支链氨基酸(如缬氨酸)在泌乳母猪氨基酸营养中也发挥着重要作用,已经成为母猪正常生长和繁殖所必需的一种氨基酸。它具有提高泌乳母猪泌乳量和仔猪断奶时体重的作用。据报道,当日粮中的赖氨酸水平超过0.9%时,缬氨酸成为第一限制性氨基酸。特别是当窝断奶仔数多于10头时,添加缬氨酸改善母猪泌乳性能的效果更加明显。

在满足母猪氨基酸的同时,要注意氨基酸之间的互作,如,赖氨酸和缬氨酸在促进窝增重方面的作用效果具有累积性。在生产上,要注意二者的适宜比例,过量使用赖氨酸会导致缬氨酸不足。为了促进窝增重,当断奶窝仔数多于10头时,母猪需要摄入569 g/d(1.2%)的赖氨酸,且缬氨酸/赖氨酸为120:100;而对于断奶窝仔数少于10头的母猪摄入379 g/d(0.8%)的赖氨酸,且缬氨酸比赖氨酸为100:100即可满足其需要^[11]。通常,血粉、羽毛粉和酪蛋白等原料缬氨酸的含量,在5%

以上,可作为母猪日粮缬氨酸的良好来源,对提高母猪泌乳量和断奶仔猪体重效果显著。总之,对于泌乳母猪来说,氨基酸的营养十分重要。合理的氨基酸供给,是保证泌乳母猪较高泌乳力和仔猪较高成活率的关键。这一点在配制日粮时应该加以注意。

3.5 提供母猪合理的饲喂方案 妊娠期采食量和体重的增加,而泌乳期采食量降低,体重损失增大。因此,在妊娠期对母猪进行限量饲喂,有利于在泌乳期提高采食量。在妊娠的最后一个多月胎儿生长发育快,营养需要相应增高。因此,除了在妊娠的最后1个月可适当提高饲喂量外,其余时间一般要对妊娠母猪进行低水平饲喂。为了最大限度的提高泌乳母猪的采食量,也可按照料槽空了,再加饲料进去的饲喂方法,以保证母猪始终能吃到饲料。Whittemore^[12]对母猪在整个繁殖周期的饲喂方案作了较好的总结。

4 小结

现代繁育技术已使母猪繁殖性能得到很大提高,同时也对现代高产母猪的营养策略提出了新的要求。为了更好的满足母猪在泌乳期间的营养需要,通过采取合理的营养饲养策略,充分满足泌乳母猪高能量水平摄入的要求,最大限度的提高其采食量,以增加产奶并减少体重损失^[13]。同时,要全面考虑日粮中其他营养物质的水平及饲料的组合效应,以充分发挥泌乳母猪的繁殖潜力,缩短母猪发情间隔,提高断奶仔猪的成活率和窝重,从而提高母猪的繁殖性能和养猪业的经济效益。

参考文献:

- [1] 王自恒. 母猪能量需要量的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2002. 14-20.
- [2] 刘惠芳, 周安国, 吴德, 等. 泌乳母猪的营养[J]. 中国饲料, 2004, (3):31-34.
- [3] Noblet J, et al. Energy cost of atanding activity in sows[J]. lives. Prod. Sci, 1993, (34):127-136.
- [4] Neil J. Prediction of digestibility of nutrients and energy Values Pig diets from chemical analysis[J]. Anim. Sci, 1996, (71):3389-3398.
- [5] 姚康, 印遇龙, 黄瑞林. 影响母猪泌乳期采食量的主要因素[J]. 中国饲料, 2007, (3):7-9.
- [6] 董国忠. 哺乳母猪采食量的重要性[J]. 动物营养学报, 2007, 19(Suppl):446-453.
- [7] 周虚. 营养对猪繁殖的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2002, (3):353-355.
- [7] 于桂阳, 黄武光, 黄杰河, 等. 高产母猪的能量和蛋白质营养和饲养策略[J]. 畜禽业, 2005, (1):6-8.
- [8] 唐晓玲, 宋春玲. 母猪的能量营养[J]. 中国饲料, 2003, (11):19-21.
- [9] Pettingrew J W, et al. Natri- Quest Ine. NTW, 1993. 5-6.
- [10] 李朕杰, 邢桂红, 安东亚, 等. 母猪繁殖力的营养调控[J]. 猪业科学, 2007, (11):56-57.
- [11] 张伟, 腾冰. 哺乳母猪的氨基酸营养[J]. 畜禽业, 2000, (8):24-26.
- [12] Whittemore C. Optimisation of feed supply to growingpigs and breeding sows. In:Kyriazakis I, Whittemore C T. ed. Whittemore's Science and Practice of Pig Production[M]. 3rd Edition. Oxford:Blackwell Publishing, 2006. 472-506.
- [13] 程伟. 哺乳母猪的营养和饲养策略[J]. 养猪, 2001, (2):12-15.

石家庄启动生猪追溯体系试点

日前,从河北省石家庄市畜牧水产局获悉,该市将从2010年启动生猪追溯体系试点建设,实现从生猪养殖到出栏、屠宰加工,再到上市销售全程质量安全信息追溯查询。另外,还将对生猪实行“一证两书”制度,即在全市生猪养殖场出栏环节施行《动物检疫合格证明》和瘦肉精等自检合格报告书或未添加违禁物的保证书。

据石家庄市畜牧水产局的负责人介绍,2010年启用畜产品质量检测联网,市畜牧水产局和市畜产品质量监测中心建立监控室,18个县级畜产品质监站检测仪器与市级监控室联网,实现对县级质监站检测情况的实时监控。省会大型畜产品批发市场自检室配备酶标仪等速测设备,与市级监控室联网,实现对市场自检室自检情况实时监控,并加大畜产品及水产品的检测密度,同时,2010年新增标准化规模养殖场100个以上。(信息来源:<http://www.china-ah.com/>)

仙湖肉鸭 A 系种蛋重与蛋形指数对孵化效果的影响

吕敏芝, 董广强, 黄敏仪, 黄得纯
(佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 将仙湖肉鸭 A 系种蛋按蛋重分为 7 组、按蛋形指数大小分为 6 组, 在相同条件下孵化, 结果表明, 蛋重不仅对孵化率、死胚率影响较大, 而且对受精率亦有影响。当蛋重在 95~99g (D 组) 时, 孵化效果最好, 种蛋受精率 96.18%, 受精蛋孵化率高达 83.86%, 入孵蛋孵化率达 80.66%。当蛋重大于 110g 时, 种蛋受精率下降至 89.74%, 受精蛋孵化率下降至 71.43%, 入孵蛋孵化率下降至 64.10%; 当蛋重小于 85g 时, 受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率分别下降至 73.02% 和 71.88%。蛋形指数对孵化率、死胚率影响也较大, 当蛋形指数为 0.66~0.74 时, 受精蛋孵化率达 80% 以上, 入孵蛋孵化率达 76% 以上, 死胚率小于 15%, 孵化效果较好, 且与其它各组差异显著。

关键词: 仙湖肉鸭; 蛋重; 蛋形指数; 孵化效果
中图分类号: S834.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0010-03

禽蛋的人工孵化是现代家禽业生产经营过程中的关键环节, 是现代家禽种族快速繁衍的唯一方法, 在家禽的繁殖和生产经营中具有相当重要的地位。影响禽蛋孵化率的因素很多, 除孵化条件直接影响孵化效果外, 种蛋的品质起着决定性的作用, 而蛋重和蛋形指数是衡量种蛋品质的两个重要指标^[1,2]。本试验的目的旨在研究仙湖肉鸭 A 系蛋重、蛋形指数与孵化效果的关系, 为进一步提高仙湖肉鸭种蛋孵化率提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 仙湖肉鸭 A 系种蛋、上海三圈牌游标卡尺(精确度 0.2 mm)、电子称、孵化时采用广东中山家禽孵化机厂生产的“新力牌”9F-11160C 型电气孵化机。

1.2 试验方法 供试种蛋来自于佛山科学技术学院科研禽场种鸭基地 A 系 F16 代核心群母鸭 2008 年 10 月 11 日至 2008 年 10 月 15 日连续 5 天所产的种蛋。

1.2.1 合格种蛋的分组 把合格的种蛋编号并称重, 按 <85, 85~89, 90~94, 95~99, 100~104, 105~109, ≥110 g 把所有种蛋分为 A、B、C、D、E、F 和 G 共 7 个水平组。用游标卡尺测量, 求出各枚种蛋的蛋形指数(蛋形指数=短径/长径), 并按 <0.66, 0.66~0.68, 0.69~0.71, 0.72~0.74, 0.75~0.77, ≥0.78 把所有种蛋分为 H、I、J、K、L 和 M 共 6 个水平组。

1.2.2 孵化及出雏记录 将合格种蛋用稀释的高

锰酸钾溶液进行清洗消毒、码盘装入蛋车各层连同孵化场的其他种蛋一起入孵化机。待孵化机内温度升至 37.9℃ 后, 将机门打开, 并将风门位置调至最大通风 1 h, 自种蛋入孵起每 2 h 自动翻蛋一次并观察记录温、湿度情况。孵化至第 7 天进行“头照”, 剔除并记录统计无精蛋和死精蛋; 第 26 天移盘后停止翻蛋; 孵化 28 d 出雏, 记录统计出雏数和死胚数。计算种蛋受精率、死胚率、受精蛋孵化率和入孵蛋孵化率等指标。孵化期控制条件见表 1。

表 1 孵化期条件控制

孵化天数 (d)	孵化温度 (°C)	孵化湿度 (%)	风门位置	翻蛋控制
1~7	37.90	57	1/4	每 2h 自动翻蛋 1 次, 角度为 50°
8~14	37.83	55	1/3	
15~21	37.50	65	1/2	
22~28	37.30	65	1/2	

1.3 统计分析 利用 MS Excel 2003 对测定数据进行整理, 再用 DPS (Data Processing System) 软件进行百分率资料差异显著性检验^[3]。

2 结果与分析

2.1 不同蛋重的孵化效果

2.1.1 蛋重与受精率、死精率、死胚率的关系 见表 2 及图 1、图 2。蛋重不同对受精率有影响, A 组受精率最高, G 组最低, 且 A 与 G、D 与 G 比较均差异显著; 其余各组间受精率虽有差异, 但差异不显著。不同蛋重对 1~7 天死精率及 8~28 天死胚率的影响非常明显, A、B、D 组死精率达 10% 以上, 显著

表 2 不同蛋重种蛋的孵化效果比较

组别	入孵蛋数(枚)	无精蛋数(枚)	受精蛋数(枚)	受精率(%)	1~7d 死精蛋数(个)	1~7d 死精率(%)	8~28d 死胚数(个)	8~28d 死胚率(%)	出雏数(只)	受精蛋孵化率(%)	入孵蛋孵化率(%)
A	64	1	63	98.44 ^a	7	11.11 ^a	10	15.87 ^b	46	73.02 ^c	71.88 ^b
B	177	13	164	92.66 ^{ab}	17	10.37 ^a	12	7.32 ^{cd}	135	82.32 ^a	76.27 ^{ab}
C	251	16	235	93.63 ^{ab}	10	4.25 ^c	28	11.91 ^{bc}	197	83.83 ^a	78.49 ^{ab}
D	393	15	378	96.18 ^a	39	10.32 ^a	22	5.82 ^d	317	83.86 ^a	80.66 ^a
E	196	9	187	95.41 ^{ab}	14	7.49 ^{ab}	26	13.90 ^{bc}	147	78.61 ^{ab}	75.00 ^{ab}
F	85	5	80	94.12 ^{ab}	3	3.75 ^c	18	22.5 ^a	59	73.75 ^{bc}	69.41 ^{bc}
G	39	4	35	89.74 ^b	2	5.71 ^{bc}	8	22.86 ^a	25	71.43 ^c	64.10 ^c

1): 同一列肩标字母相同或有相同字母者, 表示差异不显著; 肩标字母相邻者, 表示差异显著; 肩标字母相间者, 表示差异极显著。以下同。

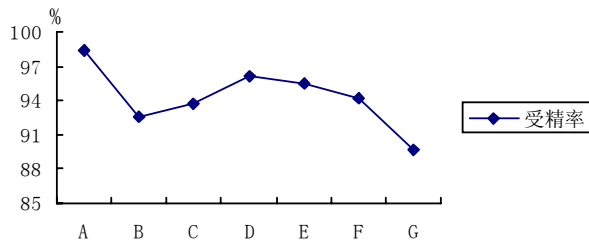


图 1 蛋重与受精率的关系

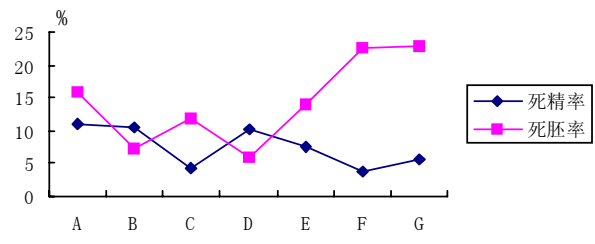


图 2 蛋重与死精率、死胚率的关系

地高于 G 组, 极显著地高于 C、F 组; D 组 8~28 天死胚率最低, 只有 5.82%, 极显著地低于 A、F、G 组, D 组与 C、E 组比较, 亦差异显著。

2.1.2 蛋重与孵化率的关系 见表 2 及图 3。D 组的受精蛋孵化率及入孵蛋孵化率最高, 分别达 83.86%、80.66%, 其次是 C 组、B 组, 三组间的受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率均差异不显著。A、G 组的受精蛋孵化率较低, 与 B、C、D 组间差异极显著, 与 E 组差异显著, 与 F 组差异不显著。G 组的入孵蛋孵化率最低, 只有 64.1%, 与 D 组比较差异极显著, 与其它组比较差异显著 (F 组除外)。从图 3 可知, 随着蛋重的增加, 受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率也有所增加, 到一定程度后反而缓慢降低, 分布趋势类似抛物线, 呈一种曲线相关关系。

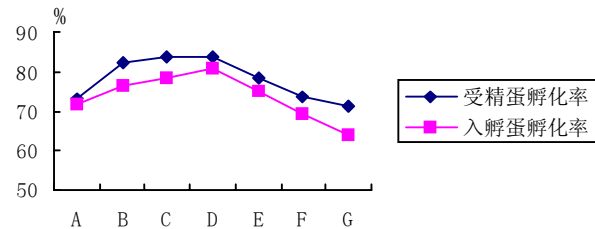


图 3 蛋重与受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率关系

2.2 不同蛋形指数的孵化效果

2.2.1 蛋形指数与受精率、死精率、死胚率的关系 见表 3 及图 4、图 5。除 H 组的受精率稍低

外, 其余各组的受精率均达 93.48% 以上, 且各组间差异不显著。1~7 天死精率 I 组最低, 只有 4.76%, 它与 J、K、M 组比较差异显著, 与 H 组比较差异极显著; 8~28 天死胚率 J 组最低, 只有 7.28%, 与 K 组比较差异不显著, 与 I、L、M 组间差异显著, 与 H 组比较差异极显著。说明 1~7 天死精率、8~28 天死胚率这两个指标受蛋形指数的影响较明显。从图 5 可见, 死精率及死胚率曲线均呈中间低, 两头高的分布趋势。

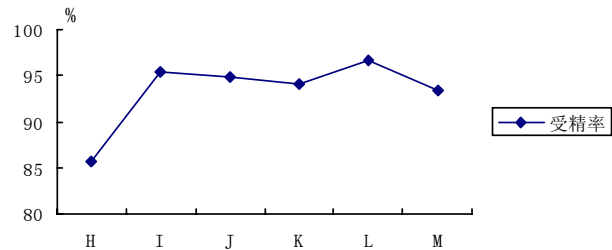


图 4 蛋形指数与受精率的关系

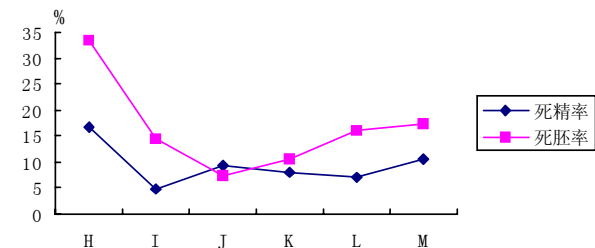


图 5 蛋形指数与死精率、死胚率的关系

表 3 不同蛋形指数种蛋的孵化效果比较

组别	入孵蛋数 (枚)	无精蛋数 (枚)	受精蛋数 (枚)	受精率 (%)	1~7d 死精 蛋数(个)	1~7d 死 精率(%)	8~28d 死 胚数(个)	8~28d 死 胚率(%)	出雏数 (只)	受精蛋孵 化率(%)	入孵蛋孵 化率(%)
H	14	2	12	85.71 ^b	2	16.67 ^a	4	33.33 ^a	6	50.00 ^c	42.86 ^d
I	66	3	63	95.45 ^a	3	4.76 ^c	9	14.29 ^c	51	80.95 ^a	77.27 ^a
J	275	14	261	94.91 ^a	24	9.20 ^{ab}	19	7.28 ^d	218	83.52 ^a	79.27 ^a
K	458	27	431	94.10 ^a	34	7.89 ^b	46	10.67 ^{cd}	351	81.44 ^a	76.64 ^a
L	303	10	293	96.70 ^a	21	7.17 ^{bc}	47	16.04 ^{bc}	225	76.79 ^{ab}	74.26 ^{ab}
M	92	6	86	93.48 ^{ab}	9	10.47 ^{ab}	15	17.44 ^{bc}	62	72.09 ^b	67.39 ^c

2.2.2 蛋形指数与孵化率的关系 见表 3 和图 6。I、J、K 组的受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率均较高,且以 J 组最好,但三组间这两个指标均差异不显著。H 组的受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率在各组中最低,且与 I、J、K 比,差异极显著,与其它组比也差异显著。图 6 曲线表明,蛋形指数与孵化率之间呈曲线相关,孵化率随蛋形指数的变化而变化,先是随着蛋形指数的增大而增加,达到一定程度后反而有所下降。

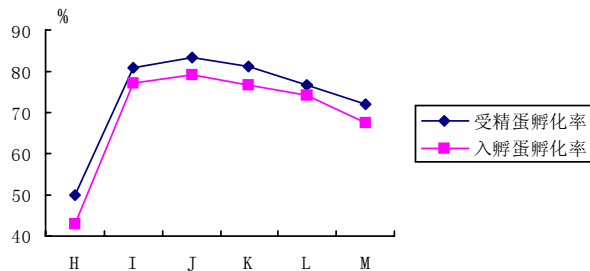


图 6 蛋形指数与受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率的关系

3 讨论

3.1 关于蛋重对孵化效果的影响 本试验结果表明,仙湖肉鸭蛋重对受精率有影响,对胚胎死亡率和孵化率的影响更大。当蛋重为 95~99 g (D 组),受精蛋孵化率和入孵蛋孵化率最高,分别为 83.86% 和 80.66%,当蛋重大于 110 g (G 组) 和小于 85 g (A 组) 时受精蛋孵化率和入孵蛋孵化率极显著地降低。蛋重偏大、偏小,死精率、死胚率也显著提高。其中蛋越重,孵化率下降的幅度越大。这是由于种蛋过大,孵化前期胚胎感温和孵化后期胚胎散热不良,胚胎发育失调,致使死胚率增加,孵化率下降;而种蛋过小,因孵化前期胚胎感温过强和孵化后期胚胎散热过快,水分蒸发过度而致胚胎死亡。因此,在生产实践中,必需选择大小适宜的种蛋进行孵化。

3.2 关于蛋形指数对孵化效果的影响 本试验结果表明,仙湖肉鸭蛋形指数对受精率影响较大,对胚胎死亡率和孵化率有明显的影响。当蛋形指数为 0.69~0.71 (J 组) 时,受精蛋孵化率和入孵

蛋孵化率最高,分别为 83.52% 和 79.27%,其孵化期死胚率最低,且与其它组相比差异极显著,其次是 I 组及 K 组。这是因为种蛋扁圆适中,孵化前期胚胎感温和孵化后期胚胎散热良好,有利于胚胎发育,因而死胚率低、孵化率高;若种蛋太圆,蛋形指数在 0.74 以上,则易因气室太小而导致气体供应不足胚胎窒息死亡。蛋形指数在 0.66 以下也将导致孵化率降低,且降低的幅度极显著。这是由于蛋形过长,气室小,到孵化后期因空气不足或胚胎不易转身破壳、易与蛋壳粘连而窒息死亡。蛋形指数对胚胎死亡率和孵化率的影响比蛋重的影响要大,蛋形指数的标准受品种的影响较小,仙湖肉鸭种鸭蛋的蛋形指数在 0.66~0.74 之间其孵化效果良好,超过这个范围,孵化效果显著降低。

4 小结

4.1 仙湖肉鸭 A 系种蛋蛋重不仅对孵化率、死胚率影响较大,而且对受精率亦有影响。当蛋重在 95~99 g (D 组) 时,孵化效果最好,种蛋受精率 96.18%,受精蛋孵化率高达 83.86%,入孵蛋孵化率达 80.66%。当蛋重大于 110 g 时,种蛋受精率下降至 89.74%,受精蛋孵化率下降至 71.43%,入孵蛋孵化率下降至 64.10%;当蛋重小于 85 g 时,受精蛋孵化率、入孵蛋孵化率分别下降至 73.02% 和 71.88%。

4.2 仙湖肉鸭 A 系种蛋蛋形指数对孵化率、死胚率影响也较大,当蛋形指数为 0.66~0.74 时,受精蛋孵化率达 80% 以上,入孵蛋孵化率达 76% 以上,死胚率小于 15%,孵化效果较好,且与其它各组差异显著。

参考文献:

- [1] 杨宁. 家禽生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 70-72.
- [2] 宋远见, 张芳, 陈彦, 等. 蛋形指数和蛋重对罗曼褐壳蛋鸡种蛋孵化率的影响[J]. 湖北农业科学, 2005, (5): 565-566.
- [3] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统[M]. 北京, 科学出版社, 2007: 74-79.

酶制剂对肉鸭生产性能的影响研究

汪前红^{1,2}, 李俊波², 贺建华^{1*}, 徐运杰²

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 唐人神集团研发中心, 湖南 株洲 412007)

摘要: 选用17日龄临床健康、体重相近双鬼头肉鸭250羽, 随机分5个处理, 每个处理5个重复, 每个重复10羽, 分别饲以日粮A(正常磷水平组, 有效磷0.30%)、B(低磷水平组, 有效磷0.20%)、C(B+I酶, 200g/t)、D(B+酶II, 200g/t)和E(B+酶III, 200g/t和酶IV, 100g/t)5种不同日粮, 进行了30天的饲养试验。结果表明: 在本试验条件下, 酶制剂对17-47日龄双鬼头肉鸭的生产性能和经济效益无显著影响($P>0.05$)。

关键词: 酶制剂; 生产性能; 双鬼头肉鸭; 经济效益

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0013-03

Influence of enzyme preparation on production performance in meat ducks

Wang Qianhong^{1,2}, Li Junbo², He Jianhua¹, Xu Yunjie²

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Research Center of Human Tangrenshen Group, Zhuzhou 412007, China)

Abstract: Two thousand and fifty hundred clinical healthy 17-day-old ducks with similar weight were randomly divided into 5 treatment groups. Each group was assigned 5 replicates and 10 ducks in each replicate. Ducks were fed with diet A (normal phosphorus level, available phosphorous is 0.30%), diet B (low phosphorus level, available phosphorous is 0.20%), diet C (B + enzyme I, 200g / t), diet D (B + Enzyme II, 200g / t) and diet E (B + enzyme III, 200g / t and enzyme IV, 100g / t) every day respectively for 30 days. The results showed that there were no significant influence of the enzyme preparation on the production performance of 17 to 47 days old meat duck and economic benefits($P>0.05$).

Key words: Enzyme preparation; production performance; meat duck; economic benefits

饲用酶制剂是经基因技术选出的细菌或真菌株的发酵产物, 包括特异的粗酶制剂和复合酶制剂。它能提高动物生产性能, 发挥动物生产潜力, 改善饲料转化率, 降低饲料成本, 且具有安全无毒、无残留和无耐药性等优良特点, 是公认的最具潜力的饲料添加剂之一。玉米是我国的主要能量饲料, 由于玉米资源短缺而价格上涨, 目前在日粮配制时常采用小麦替代玉米。小麦的蛋白、赖氨酸及内源植酸酶含量较玉米高, 但是, 由于抗营养因子-非淀粉多糖(Non-starch polysaccharide, NSP)的制约, 限制了麦类作物在饲料工业中的广

泛应用。单胃动物体内由于缺乏分解非淀粉多糖的酶, 所以阻碍了其对营养物质的消化吸收, 降低饲料利用率, 同时动物采食小麦后排出粘稠粪便, 给粪便处理和疾病控制带来困难, 这也限制了小麦在畜禽饲料中的应用。因此, 在小麦型饲料中普遍添加非淀粉多糖酶以消除其抗营养特性^[1,2]。非淀粉多糖酶(NSP酶)包括半纤维素酶、纤维素酶和果胶酶, 其中半纤维素酶主要包括木聚糖酶、甘露糖酶等。以NSP酶为主的复合酶制剂在动物小麦型日粮中的应用效果十分显著, 通过消除饲料中NSP的抗营养作用, 从而显著提高单胃动物的

生产性能和饲料转化率^[3]。有关在小麦型日粮中添加酶制剂对家禽生产性能的影响报道较多^[4,5]。但结论不一,这与动物品种和日龄有密切关系。为在双鬼头肉鸭饲养中合理选用添加酶制剂提供理论支持,本研究探索了四种不同酶制剂对该品种肉鸭生产性能和经济效益的影响。

1 材料与方法

1.1 试验设计 试验采用单因子完全随机试验设计。选用 17 日龄临床健康、体重相近的双鬼头肉鸭 250 羽,随机分成 5 个处理,每个处理 5 个重复,每个重复 10 羽鸭。

1.2 试验材料 酶制剂购自某知名厂家生产的酶 I、酶 II、酶 III 和酶 IV。其中,酶 IV 为一种液体植酸酶产品,其产品活性 $\geq 5\ 000\ \text{IU/g}$;酶 III 为一种液体复合酶产品,其酶系组成及活性为:木聚糖酶 $\geq 10\ 000\ \text{IU/g}$,纤维素酶 $\geq 10\ 000\ \text{IU/g}$, β -葡聚糖酶 $\geq 15\ 000\ \text{IU/g}$;酶 II 的酶系组成同酶 III,但活性约为其各酶系活性的两倍;酶 I 为 L-200 液态型,由六种不同的酶组成。酶活单位的定义是:①非淀粉多糖酶活单位(木聚糖酶、纤维素酶、 β -葡聚糖酶、果胶酶、甘露聚糖酶)指在测定条件下,每分钟降解相应底物释放 $1\ \mu\text{g}$ 还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位;②CMC 酶活单位定义指纤维素酶每分钟水解底物羧甲基纤维素钠(CMC-Na)产生 $1\ \mu\text{g}$ 还原糖(以葡萄糖计)所需酶量为一个酶活力单位;③FPA 酶活指纤维素酶每分钟水解滤纸(新华一号,定性滤纸)产生 $1\ \mu\text{g}$ 还原糖(以葡萄糖计)所需酶量定义为一个酶活力单位;④植酸酶活单位指在 37°C 、pH 值 5.5 的条件下,每分钟从浓度为 $5.0\ \text{mmol/L}$ 的植酸钠中释放出 $1\ \mu\text{mol}$ 无机磷所需要的酶用量为一个植酸酶活力单位。其产品酶系及分析保证值如表 1。

表 1 酶 I 酶系组成

纤维素酶		木聚糖酶	β -葡聚糖酶	果胶酶	甘露聚糖酶	植酸酶
CMC 酶活	FPA 酶活					
3.5 万	2500	125 万	100 万	3 万	1 万	2500

1.3 试验日粮 共 5 种日粮,分别为:日粮 A(正常磷水平组,有效磷 0.30%)、B(低磷水平组,有效磷 0.20%)、C(B + I 酶, $200\ \text{g/t}$)、D(B + 酶 II, $200\ \text{g/t}$) 和 E(B + 酶 III, $200\ \text{g/t}$ 和酶 IV,

$100\ \text{g/t}$)。日粮组成及营养水平见表 2。

表 2 日粮组成及营养水平

原料(%)	A	B	C	D	E
玉米	32.22	32.22	32.22	32.22	32.22
小麦	33.00	33.00	33.00	33.00	33.00
油糠	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
豆粕	9.64	9.64	9.64	9.64	9.64
肉骨粉	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
菜粕	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
棉粕	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
啤酒糟	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
石粉	1.13	1.49	1.49	1.49	1.49
磷酸氢钙	0.62				
食盐	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
赖氨酸	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
蛋氨酸	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
防霉剂	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
沸石粉	1.84	2.10	2.10	2.10	2.10
禽用多矿 ¹⁾	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
禽用多维 ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
复合酶制剂			酶 1	酶 2	酶 3
合计	100	100	100	100	100
营养水平 ³⁾					
代谢能(Kcal/g)	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
粗蛋白(%)	16.80	16.80	16.80	16.80	16.80
赖氨酸(%)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
蛋氨酸(%)	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
蛋+胱氨酸(%)	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
钙(%)	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
磷(%)	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5
有效磷(%)	0.30	0.20	0.20	0.20	0.20

1): 禽用多矿可为每千克全价料提供: 锰 140mg; 锌 140mg; 铁 80mg; 铜 16mg; 碘 0.8mg; 硒 0.6mg; 2): 禽用多维可为每千克全价料提供: VA48000IU; VD37200IU; VE24mg; VK34mg; VB112mg; VB238mg; VB624mg; VB120.12mg; 烟酸 456mg; 泛酸钙 114mg; 叶酸 2.4mg; 生物素 0.12mg; 3): 日粮营养水平均为配方计算值。

1.4 饲养管理 试验期为 30 天,料型为粒料, MU-ZL180 制粒机制粒,粒径 2.5 mm,压缩比 1:6,制粒温度 $80\pm 2^\circ\text{C}$ 。液体酶的添加均采用后喷涂工艺。试验于 2009 年 3-4 月在唐人神集团家禽研究中心进行,采用网上平养,每栏饲养面积为 $3.6\ \text{m}^2$ 。试验期间,安排专人负责饲养管理,自由采食和饮水,自然通风,保持栏舍清洁卫生。

1.5 考察指标

1.5.1 采食量 记录各栏鸭耗料,计算平均采食量。

1.5.2 日增重 第 47 日龄上午进行空腹称重, 计算各栏鸭平均日增重。

1.5.3 料肉比 根据采食量和日增重计算料肉比。

1.5.4 末重 以栏为单位, 记录试验结束时鸭的体重。

1.5.5 经济效益分析 根据鸭料肉比和配方成本计算各处理组每千克增重的成本, 计算其经济效益。

2 统计分析

应用统计分析软件 SPSS 16.0 对试验结果进行单因素方差分析及 Duncan 氏多重比较, 试验数据采用平均数±标准误表示。显著性水平选择 0.05。

3 结果与分析

3.1 生产性能指标 试验阶段双鬼头肉鸭生产性能见表 3。由表 3 可知: 各日粮处理组平均日增重、平均日采食量、料肉比和末重差异均不显著 ($P>0.05$)。

3.2 经济效益分析 各处理经济效益见表 4。由表 4 可知: 各处理的单位增重成本和相对成本差异不显著 ($P>0.05$), 但以处理 D 相对经济效益最佳。

4 讨论

日增重、日采食量和料肉比等指标客观而直接的反映了在相同饲养管理条件下畜禽生产性能

的高低。影响采食量的决定性因素是体重, 其次是环境温度、能量浓度、饲养体制、生理阶段、适口性及饲养密度等因素。料肉比是评价饲料报酬的一个重要指标, 也是编制生产计划和财务计划的重要依据。料肉比高, 说明单位增重消耗饲料多, 饲料报酬相对较低。在本试验条件下, 各种饲用酶制剂均未对 17-47 日龄双鬼头肉鸭生产性能构成显著影响 $P>0.05$ 。这与高宁国等^[6]报道的在米糠基础日粮中添加 0.1% 的粗酶制剂对肉鸭生长性能无影响的结果一致。Hong 等^[7]报道, 玉米小麦型日粮中添加复合酶(淀粉酶, 蛋白酶和木聚糖酶)对肉鸭的养分消化率和生产性能无明显影响。王海英等^[5]报道, 在小麦和玉米各半的肉仔鸡日粮中添加木聚糖酶后, 只有食糜粘度显著降低, 其余生产性能指标无明显改善。这与 Bedford^[8]和俞路等^[9]的报道相反。产生差异的原因可能有: ①产品差异: 各种酶制剂产品间存在较大差异, 如酶含量和酶活力等; ②动物差异: Jamroz 等^[10]报道, 鸡和鸭对粗纤维的消化能力不同, 鸭比鸡消化 NSP 的能力更强, 同时, 肠道对水分的吸收能力更好。Scott 等^[11]用水和饲料比为 4.2:1 与 2.3:1 两种饲喂方

表 3 不同复合酶对双鬼头肉鸭生产性能的影响

处理	初重(g/只)	平均日增重(g/只·天)	平均日采食量(g/只·天)	料肉比	末重(g/只)
A	581.0±9.6 ¹⁾	51.0±1.6	155.0±1.9	3.04±0.01	2112.0±50.5
B	579.0±8.2	50.0±1.8	153.8±1.9	3.08±0.06	2080.0±53.9
C	579.0±8.9	49.5±0.5	154.6±0.7	3.12±0.04	2064.0±14.2
D	580.0±7.9	51.3±1.1	154.2±1.8	3.01±0.05	2118.0±34.7
E	577.0±4.5	49.1±1.8	150.5±3.5	3.02±0.08	2051.0±53.0
P 值	0.951	0.356	0.232	0.243	0.345

1): 同列无肩注字母者表示差异不显著 ($P>0.05$)。下同。

表 4 各处理经济效益分析

处理	日粮成本 ¹⁾ (元/吨)	料重比	单位增重成本(元/kg)	相对成本(元/kg)	相对经济效益 ²⁾ (%)
A	2163.02	3.04	6.58	-	-
B	2145.21	3.08	6.61	↑0.03	↓0.5
C	2155.21	3.12	6.72	↑0.14	↓2.1
D	2155.21	3.01	6.49	↓0.09	↑1.4
E	2155.21	3.02	6.51	↓0.07	↑1.1

1): 日粮成本以原料市场价格计算; 添加的液体酶制剂成本均设定为 10 元/吨; 2): 经济效益分析以日粮处理组 A(对照组)为对照, “↓”表示下降, “↑”表示上升;

(下转第 26 页)

狮头鹅人工授精技术及其应用研究

马江耀¹, 陈进胜², 卢金伦³

(1. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640; 2. 饶平县畜牧兽医站, 广东 饶平 515700;

3. 饶平县禽畜良种繁育基地, 广东 饶平 515700)

摘要: 本文介绍狮头鹅人工授精技术, 主要包括人工授精前准备、采精方法、精液品质检测、精液稀释及保存、输精方法等五大操作要点。并对该技术的应用效果进行了研究, 结果显示: 人工授精组的种蛋受精率达到 87.5%, 比自然配种组提高了 25.1%; 人工授精组的受精蛋孵化率达到 90.0%, 比自然配种组提高了 1.0%。

关键词: 狮头鹅; 人工授精

中图分类号: S835.3²

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0016-03

狮头鹅是目前世界上体型最大的鹅种之一, 原产地饶平县溪楼村, 成年体重达 10 kg 以上, 是一个优秀的地方家禽品种^[1]。其具有耐粗饲、生长速度快、饲料报酬高、抗病力强、肉质鲜美等特点, 年产蛋量约 30 个^[2]。受多种因素影响, 自然交配情况下, 种蛋平均受精率只有 60%左右, 制约了养鹅业发展, 人工授精技术的应用能有效改善这一状况。

鹅人工授精技术研究已有五十余年历史, 我国起步较晚^[3], 随着养鹅业向集约化生产方向发展而日益受到重视。采用种鹅人工授精技术, 可以降低饲养成本、减少性器官疾病的传染、促进品种改良、提高经济效益, 其中最明显的是提高种蛋受精率和孵化出雏率^[4]。为此, 我们在饶平县禽畜良种繁育基地开展了狮头鹅体外人工授精技术研究, 现将该技术要点和应用效果总结如下。

1 鹅人工授精前的准备

1.1 种公鹅的选择 公鹅选择叫声洪亮、体质健壮、羽毛有光泽、肥瘦适中的优良个体。用手提鹅的颈部离开地面, 鹅两腿用力向前侧方蹬动, 同时双翅频频拍打。生殖器官发育完全, 6 月龄公鹅翻肛检查, 阴茎长度应在 4 cm 以上, 直径在 0.8 cm 以上, 没有生殖系统疾病^[5]。

1.2 种母鹅的选择 种母鹅要求外貌清秀, 颈细长, 眼睛有神, 肥瘦适中, 羽毛整齐、紧密和有光泽, 前躯较浅, 后躯宽深, 腹部圆大, 胫结实、强健, 间距宽。

1.3 器具的准备 人工授精前先准备好各种器具, 包括集精器、输精器、注射器、稀释液、脱脂棉花、75%酒精、输精台(高 60~80 cm)、显微镜及其配套器具、消毒器具、保温瓶、围栏等。采精所需器械必须经清洗、干燥、高温高压灭菌消毒后备用。稀释液需在高压锅内灭菌 15~30 min, 自然冷却后备用。

1.4 种公鹅采精前训练 采精训练前 15~30 d, 将体格健壮、性欲旺盛的备用种公鹅和母鹅分开饲养。训练时剪去公鹅泄殖腔周围直径 5~7 cm 的羽毛, 按照按摩采精法的操作方法, 每天定时逐只对成熟健康的公鹅训练 1~2 次, 连续 5~7 d。在训练过程中将性反射弱、阴茎发育不良、采不到精或排精量少而品质又差的公鹅及时淘汰。

2 鹅人工授精操作技术

2.1 采精 我们采用的采精方法是背腹式按摩法。由助手将种公鹅保定在采精台上(桌凳均可), 右手按住鹅翅根部, 左手拿采精杯。采精者先用灭菌生理盐水棉球由中央到外围擦洗肛门, 然后左手五指分开, 掌心向下, 从公鹅翅膀根部向尾部方向有节奏地按摩, 每次 1~2 sec, 持续 4~5 次后, 左手按摩稍带挤压公鹅尾根部。同时右手拇指和食指有节奏地按摩腹部后面的柔软部, 并逐渐按摩、挤压泄殖腔环, 使其充血引起阴茎勃起。当公鹅阴茎充分勃起并外翻伸出时, 左手拇指和食指轻挤泄殖腔环背侧(使输精沟闭锁), 精液沿输精沟从阴茎顶端射出, 助手将其收集在采精杯内。

通常每次采精时间为 30 sec 至 1 min。采精时应注意不能用力过猛,防止生殖器官出血,污染精液。

2.2 精液品质检测

2.2.1 精液外观检查 外观检查系用肉眼观察精液的色泽,闻其气味,鹅的正常精液呈乳白色,形似豆浆,不透明,有粘稠性。被粪便污染的精液呈黄褐色;被尿酸盐污染的精液中,有粉白色棉絮状块;混入血液的精液为粉红色。污染过的精液,精子极易发生凝集而失活。

2.2.2 精液量检查 可用有刻度吸管或结核菌素注射器将精液吸入,然后读数。选择射精量多且稳定的公鹅供种用。

2.2.3 精子活力检查 于采精后即刻进行。方法是取精液及生理盐水各一滴,放在载玻片一端,混匀后加上盖玻片。精液不宜过多,以布满载玻片及盖玻片的空隙,而又不溢出为宜。在常温 37℃ 的条件下,置于 200~500 倍显微镜下观察。正常的精子是呈旋涡向前滚动状态。若呈圆周运动或摆动的精子均属异常精子,这类精子若占总精子量的 1/4 以上,则该精液不得用于输精。

2.2.4 精子密度检查 采用密度估测法,分密、中、稀三级。观察视野被精子占满定为“密”,观察视野中精子有一定距离为“中”,有较大间隙为“稀”^[5]。根据精子密度检查结果确定精液稀释比例。

2.3 精液稀释与保存 精液稀释的作用主要是扩充精液,增加输精量,补充营养和保护物质,减轻乳酸对精子的危害,从而延长精子在体外的存活时间。目前生产中多采用 0.9% 的生理盐水作稀释液,用时加青霉素、链霉素各 300~500 IU/mL。稀释倍数按公鹅精液品质而定,一般公鹅精液与稀释液比例为 1:1~1:3,稀释后活精子数为 3 亿~4 亿个/mL。稀释液现配现用,稀释液稀释时温度要与母鹅体温相当(38~40℃),稀释完毕后即放入保温箱内。采集精液工作结束后即对母鹅输精,或者一组人员采集公鹅精液,另一组人员同时对母鹅输精。稀释后的精液保存时间不宜超过 30 min,以免影响输精效果^[6]。

2.4 输精

2.4.1 输精方法 可分为五个步骤。第一步:固定好准备输精的母鹅,由助手两手抓住母鹅翅膀根部使其蹲卧地上或固定在高约 70 cm 的平台

上。第二步:轻压泄殖腔下缘,促使泄殖腔张开。输精前先剪去肛门周围的羽毛,用浸有生理盐水的棉球洗擦肛门后,输精员左手四指并拢把尾羽拨向一边,大拇指紧靠泄殖腔下缘,轻轻向下压迫,使泄殖腔张开。第三步:插入输精器。此时输精员右手将盛有精液的输精器沿泄殖腔左下方徐徐插入。当感到推进无阻挡时说明输精器已准确进入阴道部,一般插入深度以 5~7 cm 为宜。第四步:输入精液。此时输精员稳住输精器,将精液缓慢注入。第五步:拔出输精器。输精完毕,轻轻拔出输精器,同时松手减轻压迫,阴道口即可慢慢缩回泄殖腔,然后将母鹅轻轻放在地上。

2.4.2 输精时间 以下午 16:00~18:00 为佳。因母鹅产蛋时间多在早晨或上午,而下午子宫内多数还没有形成硬壳蛋。这时对母鹅进行人工授精,有利于精子的运行,从而提高种蛋受精率。

2.4.3 输精次数和输精量 公鹅精子在母鹅输卵管内存活和保持一定授精能力的时间可达 10 d 左右。实践证明,一般每隔 5~6 d 输精一次为好^[7];每次输精量为 0.1 mL,首次输精 0.2 mL。

3 人工授精技术应用试验

3.1 材料与方法

3.1.1 试验动物及场所 试验动物选自饶平县禽畜良种繁育基地,试验在该基地实施。

3.1.2 试验时间 本试验自 2006 年 9 月 1 日至 10 月 31 日,共计 61 d。

3.1.3 试验鹅的选择与分组 选择健康情况良好、品种特征明显、性欲旺盛的种公鹅 30 只,同时选取无病、产蛋性能优良的母鹅 200 只。将公、母鹅分别随机分成两组,试验组(人工授精组)10 只公鹅、100 只母鹅,按上述人工授精技术进行人工授精;对照组(自然交配组)20 只公鹅,100 只母鹅,任其自由交配。鹅的日粮及常规饲养管理两组一致。

3.1.4 数据的收集与处理 试验开始一周后收集并记录每组的种蛋数,收集的种蛋分批送孵化室孵化,并检测和记录种蛋的受精率和孵化出雏率。

3.2 结果与分析

3.2.1 人工授精对母鹅繁殖性能的影响 试验期间,试验组共收得种蛋 1 604 枚,其中受精蛋 1 404 枚,受精率为 87.5%,受精蛋孵化率为 90.0%,累计出雏 1 264 只;对照组共收得种蛋 1 606 枚,其中

受精蛋 1 002 枚, 受精率为 62. 4%, 受精蛋孵化率为 89. 0%, 累计出雏 892 只(见表 1)。由表 1 可见, 两组母鹅在试验期内的产蛋枚数基本相同; 人工授精组的受精率比自然交配组高出 25. 1%; 人工授精组出雏数比自然交配组多 372 只; 在受精蛋孵化率

方面, 人工授精组比自然交配组高出 1. 0%。试验结果充分显示出人工授精技术的优势。

3.2.2 人工授精经济效益分析 试验组比对照组少饲养公鹅 10 只, 每只公鹅每年饲养成本以 200 元(含鹅苗、饲料、鹅舍、工具、药物等费用)

表 1 人工授精与自然交配繁殖性能比较

交配方式	种蛋总数(枚)	受精蛋数(枚)	受精率(%)	出雏总数(只)	受精蛋孵化率(%)
人工授精	1604	1404	87. 5%	1264	90. 0%
自然交配	1606	1002	62. 4%	892	89. 0%

计, 可节约生产成本 2 000 元; 试验组比对照组多出雏鹅 372 只, 每只雏鹅售价按 30 元计, 可增加经济收入 11 160 元。两项合计增收 13 160 元。

3.3 小结 人工授精技术是一项先进的繁殖技术, 严格按照技术规程操作, 可提高种蛋受精率、增加出雏数、大大降低饲养成本, 从而显著提升养殖业经济效益, 值得深入研究和大力推广。

参考文献:

[1] 何大乾. 鹅高效生产技术手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007. 20.

[2] 林祯平, 林庆添. 狮头鹅品种资源情况调查[J]. 中国禽业导刊, 2003, 20(4): 36-37.

[3] 刘润铮, 陈祖巨, 董毓兴, 等. 狮头鹅人工授精技术的探讨[J]. 吉林农业大学学报, 1982, (1): 50-53.

[4] 陶勇, 任善茂, 董晓君. 鹅人工授精的优点及注意事项[J]. 当代畜牧, 2006, (10): 29-30.

[5] 李华慧, 吴师. 鹅的人工授精技术要点[J]. 广西畜牧兽医, 2007, 23(5): 209-210.

[6] 王文强, 张华琦, 黄昌文, 等. 四川白鹅人工授精技术及其应用研究[J]. 养禽与禽病防治, 2008, (3): 18-19.

[7] 陈晓青, 郑银潮, 姜柏芳, 等. 浙东白鹅人工授精技术及效果分析[J]. 中国家禽, 2005, 27(16): 20-21.

欢迎订阅

ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

《广东畜牧兽医科技》 (双月刊)
(1976 年创刊, 大 16 开本, 正文 52 页)

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、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

读者对象: 畜牧兽医行政管理人员、科研人员、技术推广人员, 大专院校师生, 种畜禽、兽药和饲料生产厂家技术人员, 基层畜牧兽医工作者和饲养专业户等相关人员。

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: gdxmsy@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

马岗鹅繁殖性能低下的原因分析及解决办法

岑兴洪¹, 钟建桥²

1. 肇庆市畜牧兽医局, 广东 肇庆 526040; 2. 肇庆市农机研究所, 广东 肇庆 526040

摘要: 本文从繁殖机制、光照、营养条件、饲养管理、环境因素、育种、人工授精和人工孵化共八方面分析了马岗鹅繁殖性能低下的主要原因, 提出相应的解决办法。

关键词: 马岗鹅; 繁殖障碍; 对策

中图分类号: S835.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0019-02

Problems caused low reproductive performance in Magang Geese and countermeasures to it

Cenxinghong¹, zhongjianqiao²

(1. Animal husbandry and veterinary Bureau, Zhaoqing 526040, China; 2. Agricultural machinery research institute, Zhaoqing 526040, China)

Abstract: The main problems caused low reproductive performance of Magang geese including reproduction, illumination, nutrition, feeding and management, environment, breeding, artificial fecundation and artificial incubation were discussed in this paper. The countermeasures to it also were talked in this paper.

Key words: Magang geese; breeding disorder; countermeasure

马岗鹅原产于开平市马岗镇, 其优点是适应性强, 特别能适应广东地区高温高湿的气候, 又能耐粗饲, 以草食为主。但繁殖性能低下, 年产蛋量仅为 34~40 枚, 繁殖季节在每年 6~7 月至次年 4 月初, 期间只产 4~5 窝蛋, 受精率为 81.5%, 孵化率为 92.7%; 就巢性强, 繁殖障碍相当普遍, 严重影响生产的连续性和市场的均衡供应, 不利于集约化规模生产。

1 马岗鹅主要的繁殖障碍

1.1 就巢性强、产蛋量较低 马岗鹅一般于每年的 6 月下旬开产, 通常在 10 月至次年 2 月为产蛋高峰期, 到次年 3~4 月便开始停产换羽进入休产期, 年均产蛋 34~40 枚, 母鹅一旦开始抱窝, 很快就会停止产蛋, 同时出现卵巢和输卵管退化。

1.2 性成熟较体成熟晚和雄性不育现象普遍 先天遗传因素的影响, 马岗鹅性成熟比体成熟晚 3~5 个月, 而且性器官发育呈单侧性。雄性第二性征发育不良且交配器短、细、软、性纤毛组织颜色浅白的, 配种能力较差, 受精率与孵化率都较低, 这类公鹅一般占公鹅总数的 1/4 强^[1]。

1.3 配种障碍 性行为特异与恋伴特异导致受精率较低, 马岗鹅公鹅的性行为一般在母鹅产蛋前一个月才开始, 仅维持 7~8 个月, 且在特定时间段交配, 交配行为易受外界干扰。公鹅对长期共养的母鹅出现厌伴反应, 一旦接近附近的其它母鹅则很快发生恋伴行为, 出现各种各样的求偶动作和迫切的交配期望^[2]。马岗鹅在繁殖期内的每年 10 月至次年 2 月左右产蛋达到高峰, 但这一段时间正处于冬季, 受精率较低。

1.4 种蛋孵化技术要求高、雏鹅饲养管理难度大 孵化期间对温度要求很高, 孵化中后期对湿度要求严格; 雏鹅初出壳时绒毛稀少, 调节体温机能较弱, 抗寒能力差, 难以适应外界温度的变化; 雏鹅出壳后 3~30 天, 极易感染小鹅瘟, 同时, 还会发生禽出败等疾病。

2 相应对策

2.1 抑制就巢 采用综合防治生物技术处理马岗鹅的抱窝, 即采用催乳素调控、性腺机能的促进以及行为学管理相结合的方法, 利用免疫中和技术, 通过催乳素抗体阻断催乳素的作用, 并采用中

草药制剂及牛磺酸等促进性腺发育。该方法不仅能达到醒抱目的,更重要的是能够使鹅的排卵和产蛋得到恢复,在生产中应用后,母鹅的产蛋率有所提高。

2.2 控制光照 家禽对光的效应非常敏感,减少光照时数能促使马岗鹅睾丸结构和功能恢复正常^[3]。从表 1 看出,短光照对马岗种鹅产蛋量、受精率的提高有明显的促进作用^[4]。这就为马岗种鹅反季节生产奠定了一定的基础。

表 1 控制光照对马岗鹅产蛋和受精的影响

项目	试验组	对照组	对比提高	t 检验
数量(母:公)	616:99	631:101	/	/
产蛋数(枚)	15.70	14.91	0.79(5.3%)	/
全期平均产蛋率(%)	8.58	8.15	0.43	P<0.01
全期平均受精率(%)	82.1	76.1	6.00	P<0.01

资料来源:广东鹅的繁殖特性及其控制技术探讨(朱基美等,1996年)

2.3 营养全面 产蛋期间日粮中蛋白质的含量以及氨基酸的全价性。其中赖氨酸、精氨酸、亮氨酸、缬氨酸和甘氨酸对性繁殖机能具有重要作用。维生素 A、D、E 对种鹅性机能特别重要,在每公斤配合料中其含量分别为 2 万 IU、3000 万 IU、500 mg。产蛋母鹅日粮中要有足够的钙磷含量,而且比例要恰当,钙磷比例为 4~5:1^[5]。据饲养试验结果表明,给母鹅配合适宜的日粮营养水平,是提高母鹅产蛋量的一项措施,其蛋白质需要量为 15.5%,能量为 2700 千卡,钙需要量为 0.65%。种鹅每日喂食 3 次,总量控制在每天 170 g/只左右,青料自由采食。其饲养采用的种鹅参考营养指标见表 2。

表 2 马岗鹅日粮营养指标

营养成分	含量(%)
粗蛋白质	15.5
粗灰分	14.0
粗纤维	100
总磷	0.65
钙	2.60
蛋氨酸	0.26
赖氨酸	0.62
食盐	0.25
水分	12.5

2.4 科学管理

2.4.1 雏鹅管理 雏鹅出壳后要注意保温防潮,

适时饮水开食,注意饲养的密度要适当,出壳后要注射小鹅瘟血清 0.5 mL/羽,3~5 d 后注射小鹅瘟疫苗 1 mL/羽^[6]。

2.4.2 限制饲养 对后备种鹅进行限制饲养,使其体重匀称适中,体质健壮,适时性成熟,产蛋整齐,产蛋多。

2.4.3 小群管理、分开关养 每群种鹅公母按 1:5 的比例搭配,每群不超过 300 只,公母组配在育成期就组配好,组配后不要轻易打乱配偶种群。同群的公母鹅白天一起放牧配种,晚上则分别关笼,让公母鹅之间仅闻其声,造成性隔离,可以克服厌伴反应。早上和傍晚,是交配高峰期,这时须将鹅群赶进有清洁水质的河流或池塘,任其戏水,配种,有利于提高受精率^[7]。

2.4.4 产蛋期管理 鹅舍地面铺加垫草,增加换草次数,保持清洁。产蛋期母鹅应以舍饲为主,在日粮中增加精料量,同时补喂青料^[8]。

2.4.5 休产期管理 进入停产后,将日粮由精料改为粗料,期间喂料次数逐渐减少,但不能停水,约经 13~15 d,母鹅消耗体内脂肪,鹅体消瘦,体重减轻,主翼羽和主尾羽出现干枯^[9],这时进行人工强制换羽。休产期内要充分放牧,采食较多的青料,提高鹅群的耐粗饲能力。

2.4.6 种鹅疾病预防 种鹅除了日常的管理外,还需注意做好种鹅预防疾病的工作。种鹅在开产前 15 d,使用小鹅瘟鸭胚弱毒疫苗进行皮下注射 5~8 头份/只。此外,禽流感鹅鸭瘟、禽出败和鹅副粘病毒也要注意防治。

2.5 实行人工孵化 进行人工孵化,延长母鹅的产蛋时间,对提高马岗鹅的年产蛋量是一项必不可少的技术措施。

2.5.1 种蛋验收和处理 鹅产蛋后立即拣蛋,尽快送孵化房,挑选分级后,将合格种蛋送消毒室熏蒸消毒,然后进入蛋库存放。

2.5.2 孵化与管理 (1)入孵消毒。种蛋装入孵化盘后,关闭孵化机门,再次用常规方法取高锰酸钾甲醚熏蒸消毒 1 次,熏毕,开机排净余气。(2)孵化温湿度调校。鹅胚在孵化初期和后期感温的情况都不同(孵化时采用的温度参数如表 3)。判断温度合适与否的标准是看出雏后鹅蛋壳内容

(下转第 28 页)

广东地区鸡毒支原体血清学调查

孔意端¹, 陈峰², 廖理克¹, 廖秋生¹, 覃健萍¹

(1. 广东温氏食品集团生产技術部, 广东 云浮 527439; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 应用血清快速平板凝集方法, 对广东地区 12 个非鸡毒支原体免疫的种鸡场及 3 个鸡毒支原体免疫的种鸡场进行了鸡毒支原体感染的血清学调查。结果显示: 不同种鸡场及不同品种的种鸡的 MG 抗体阳性率高峰期均在 11 周龄左右, 即鸡群的 MG 感染高峰期均在 6 周龄左右。

关键词: 鸡毒支原体; 血清学调查; 血清快速平板凝集

中图分类号: S852.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0021-03

鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 是一种严重危害养禽生产的病原体, 主要引起鸡、火鸡的慢性呼吸道病^[1]。MG 感染一年四季均可发生, 尤以冬春季节的发病率较高。MG 感染导致死亡率不高, 但可造成疫苗 (如 IB、IBD 疫苗等) 反应时间延长, 鸡只生长发育不良, 产蛋鸡产蛋量下降, 给养鸡生产带来较大的经济损失。目前, 大多数养殖场尚未成功建立完善的鸡毒支原体感染监测系统, 对于鸡毒支原体在当地的流行规律、特点和造成的损失无法作出准确的判断, 造成临床难以制订针对性的防治方案。另外, 因缺乏准确的数据显示当地鸡群在免疫鸡毒支原体疫苗前是否已受到鸡毒支原体侵袭, 致使鸡毒支原体疫苗的临床应用效果无法进行正确评价。为此, 本研究采用鸡毒支原体血清快速平板凝集方法, 检查了广东地区的 3 个经 MG 疫苗免疫的种鸡场及 12 个未免疫的种鸡场共 129 群鸡的 MG 感染情况, 以掌握 MG 的流行规律及特点, 为控制鸡毒支原体感染及由其而引起的慢性呼吸道病奠定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡毒支原体凝集试验抗原、鸡毒支原体凝集试验阳性血清、鸡毒支原体凝集试验阴性血清均购自中国兽药监察所。

1.1.2 被检血清: 2007 年 4 月, 从广东地区 12 个鸡毒支原体非免种鸡场及 3 个免疫种鸡场的不同品种、不同年龄的鸡群中随机采集。

1.2 方法 按常规方法在室温下进行血清凝集

试验^[2]。

2 结果

2.1 非免疫种鸡场的鸡毒支原体血清学检测结果 应用 SPA 对 12 个非免鸡场的 4 个主要品系的 58 群种鸡共 928 个血样进行鸡毒支原体血清学检查, 结果表明, 虽各鸡场饲养种鸡品种存在一定的差异且不同天龄种鸡的 MG 感染程度不一, 但各鸡群的 MG 抗体阳性率的高峰期最早出现于 11 周龄左右, 小于 10 周龄的种鸡的 MG 抗体阳性率相对较低 (见表 1)。

2.2 免疫种鸡场的鸡毒支原体血清学检测结果 对经 MG 疫苗免疫的 3 个种鸡场的 11~55 周龄的 41 群种鸡共 656 个样品进行鸡毒支原体血清学检查, 结果表明, 鸡群的 MG 抗体阳性率的高峰期最早发生在 11 周龄左右, 大于 21 周的 MG 抗体阳性率稍低, 各鸡场的鸡毒支原体阳性率均在 45% 以上 (见表 2)。

2.3 4 个主要品系的 MG 非免种鸡的鸡毒支原体血清学检查结果 12 个非免鸡场的 4 个主要品系的 58 群种鸡的 928 个血样进行鸡毒支原体血清学检查, 结果表明, 不同品种的鸡毒支原体感染阳性率存在一定的差异, 但所有品种 MG 抗体阳性率高峰期的最早发生于 11 周龄左右, 小于 10 周龄的种鸡及大于 31 周龄的种鸡 MG 抗体阳性率稍较低 (见表 3)。

3 讨论

3.1 鸡毒支原体单独感染一般不表现明显的临床症状, 但血清试验结果可作为鸡群 MG 感染程度

的指标。12个非免种鸡场均有较高程度的鸡毒支原体感染,其中11~30周龄是MG抗体阳性率的高峰期,本次调查的此年龄段种鸡群育雏在冬季,低温潮湿的冬春季是导致MG自然感染率较高的主要原因。大于30周龄的种鸡育雏期处于夏秋季节,其MG阳性率相对较低。因据有关调查发现^[3],当气温在30℃时,感染鸡群的气囊炎的发生率较低,而当温度在7~10℃时,气囊炎的发生率则明显上升;在温度相同的条件下,湿度越大,发病率越高。而31~55周龄种鸡群的育雏时间均在夏秋季节,鸡群的受MG袭击的时间不在育雏期间而在育成或产蛋前。随着鸡群年龄的增加,其对MG易感性有所降低,因此该年龄段的种鸡MG阳性率相对较低。此外,种鸡场采用混养的饲养方式及饲养密

度过大,导致种鸡场的MG自然感染率普遍较高。现阶段,不同种鸡场饲养的种鸡品种及鸡群数量、生物安全措施、饲养管理措施及防疫措施有所不同,是在相同季节不同鸡场MG感染率存在较大差异的重要原因之一。

3.2 3个免疫种鸡场因已进行MG疫苗免疫,其MG抗体阳性率均较高,为45%~76%。11~20周龄的种鸡离进行MG灭活苗的二次免疫时间较短,故此年龄段的种鸡的MG血清阳性率较高,随着二免后时间的推移,21~40周龄种鸡的MG血清阳性率有所下降,在低温潮湿的冬季的影响下,下降的抗体水平未能保护全部鸡只,造成部分鸡只感染而呈MG抗体阳性,引起41周龄的种鸡群整体MG阳性率上升。由此可推测:经MG灭活疫苗免疫的

表1 12个MG非免鸡场的鸡毒支原体血清学检查结果

种鸡场名及品种	不同周龄段MG阳性率(%)				
	3~10	11~20	21~30	31~40	41~55
种鸡场1(A)	- ¹⁾	-	-	-	64.6
种鸡场2(D)	-	-	56.3	-	-
种鸡场3(A、C和D)	0	40.3	41.9	43.7	29.0
种鸡场4(A、B)	15.8	70	87.0	28.1	41.6
种鸡场5(A、C)	-	-	-	-	29.2
种鸡场6(A)	-	95.6	-	66.7	52.9
种鸡场7(B)	12.5	75.0	52.1	40.6	34.4
种鸡场8(D)	-	-	62.5	37.5	28.1
种鸡场9(A、C)	-	44.7	-	-	21.9
种鸡10(A、B和C)	4.2	40.0	45.9	54.6	-
种鸡场11(A)	-	-	-	-	68.8

1):“-”表示未检查,下表同。

表2 经MG疫苗免疫的3个种鸡场的鸡毒支原体血清学检查结果¹⁾

种鸡场名及品种	不同周龄段MG阳性率(%)				
	1~10	11~20	21~30	31~40	41~55
种鸡场12(A和B)	-	66.3	58.8	56.0	76.5
种鸡场13(A、B和C)	-	60.2	53.8	66.7	59.2
种鸡场14(A、B和C)	-	62.5	46.9	47.9	62.5

1):3个免疫种鸡均在7、60天龄免疫MG灭活苗

表3 4个主要品系种鸡的鸡毒支原体血清学检查结果

品系名	不同周龄段MG阳性率(%)				
	3~10	11~20	21~30	31~40	41~55
A	15.9	45.8	55.6	48.9	52.3
B	8.3	54.8	35.4	27.1	30.0
C	-	-	25	17.5	-
D	-	80.1	43.8	18.8	67.0

种鸡群的抗体消长规律是二次免疫后 2~3 月抗体水平维持高峰, 此后持续下降。

3.3 对小于 55 周龄的 4 个主要品种的种鸡进行鸡毒支原体血清学调查的结果可发现, 虽 4 个不同品种的种鸡 MG 阳性率高峰期均集中在 11 周龄以后, 但不同品种间的 MG 阳性率存在较大的差异, 其中在 11~20 周龄时, 品系 D 的阳性率高于其它受试品种的鸡群, 而在 21~30 周龄段时, 品系 A 的阳性率最高。在同一地区的不同种鸡场, 大多采用同一的混养饲养方式, 在相同的季节饲养的不同品种的种鸡, 可能由于对 MG 的抵抗力及对环境适应性存在一定的差异而引起品种间的 MG 血清阳性率的高峰期不同, 具体原因还有待进一步探讨。

3.4 由于 MG 灭活苗对有多群不同日龄鸡群混养的鸡场的免疫效果相对较差^[4], 临床常用的 MG 疫苗主要是活疫苗。虽大量的试验结果表明各种年龄的鸡对 MG 均易感, 但 5~30 日龄是雏鸡最容易感染 MG 的日龄, 且 MG 感染的危害性远大于成鸡, 表现为: 一是由 MG 感染引起的慢性呼吸道病是导致雏鸡淘汰率上升的主要原因; 二是早期的 MG 感染容易引发慢性呼吸道病, 给鸡群后期的健康造成长期的不利影响; 三是早期的 MG 感染可降低后期的鸡毒支原体疫苗的免疫效力。因此, 为杜绝 MG 感染对鸡群后期的生产性能造成负面影响, 使疫苗达到最佳的保护效果, 在 MG 疫苗免疫前, 我

们必须保证鸡群为 MG 阴性鸡群, 确保在野毒株侵袭前, 雏鸡群已有良好的疫苗免疫。但目前为止, 国内外缺乏关于鸡群在免疫鸡毒支原体疫苗是否已受到鸡毒支原体侵袭的相关报道, 给临床应用 MG 疫苗防控 MG 感染造成较大的困难。从对春季期间饲养的种鸡进行的鸡毒支原体血清学调查结果可发现, 不同品种的种鸡的 MG 血清阳性率的高峰期集中在 11 周龄左右, 由此推算鸡群 MG 感染高峰期应在育雏期 (1~6 周龄), 而感染的高峰时间集中在冬季, 因此, 在育雏阶段的种鸡, 特别是育雏时间集中在冬季的种鸡, 必须在 6 周龄前进行鸡毒支原体疫苗的免疫, 可提高该疫苗对鸡群的保护力, 减少鸡群慢呼发生率。同时通过疫苗的保护, 降低种鸡群的 MG 蛋传率, 减少后代雏鸡育成期的慢呼发生率, 提高成活率。

参考文献:

- [1] Saif Y M. 禽病学[M]. 第十一版. 中国农业出版社, 2005. 131-146.
- [2] 国际畜牧局. 诊断试验和疫苗标准手册[M]. 北京: 农业局畜牧兽医局出版社, 1996. 401-414.
- [3] 宁宜宝. 鸡群健康的潜在杀手—鸡毒支原体病的防制[J]. 中国兽医杂志, 2003, 10(39): 44-46.
- [4] Levisohn S, Kleven S H. Avian mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum)[J]. Rev Sci Tecch, 2000, (19): 425-442.

广东养猪业加速集约化 三年内重点养殖场将扩至 300 家

1 月 24 日从省农业厅获悉, 近年来, 广东省生猪养殖行业正在悄然发生变化: 千家万户的散养体系正在逐渐淡出市场, 规模化、集约化的养殖企业日趋成为市场的主流。

去年 3 月广东省农业厅在全省范围内评选出首批 100 家生猪养殖场作为广东省重点生猪养殖场, 挂牌给予重点支持和保护。2009 年这 100 家省重点生猪养殖场能繁母猪存栏已达 25 万头, 生猪年末存栏 230.5 万头, 出栏生猪 450.97 万头, 分别比 2008 年底增长 15.4%、28.3% 和 23.6%, 分别占全省的 9%、9.5%、12.5%。

省农业厅称, 今后 3 年内重点生猪养殖场将扩大到 300 家, 在 3 到 5 年内, 这 300 家重点生猪养殖场的生猪出栏量将占全省出栏总量的 50% 左右。目前, 省农业厅正在全省范围内开展第二批 100 家广东省重点生猪养殖场的评选工作, 并将于今年 3 月正式挂牌, 进一步推动全省生猪生产向标准化、规模化、现代化发展。(信息来源: <http://www.gdagri.gov.cn/>)

猪链球菌病的组织病理学研究

李小杉^{1,2}, 杨丰利¹, 曾德年², 何宝祥¹

(1. 广西大学动物科技学院, 广西 南宁 530005; 2. 湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为更深入地了解猪链球菌病的病理学特征, 本文运用病理解剖学和组织病理学的观察方法, 对3头8月龄人工致死的猪链球菌病猪进行了病理学研究。结果表明: 死猪耳廓、颈下、腹下和四肢末端皮肤可见紫红色出血斑点; 全身多器官肿大、出血, 脾脏出血点隆起, 边缘“锯齿”样突起, 并有出血梗死区, 切面略突出; 关节肿胀, 切开后可见大量黄色渗出物, 关节窝有骨骼样赘生物是本病的主要特征。组织学表现为脏器组织呈现不同程度的出血以及嗜中性粒细胞浸润, 各脏器还出现特有的病变。

关键词: 猪链球菌; 病理解剖学; 组织学观察

中图分类号: S852.61¹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0024-03

Histopathological study of Streptococcus Suis disease

Li Xiao-shan^{1,2}, Yang Feng-li¹, Zeng De-nian², He Bao-xiang¹

(1.College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;2.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to gain a further understanding on the pathology of streptococcus suis disease, we used the methods of pathological anatomy and histopathology to research the pathological characteristics of three 8-month-old pigs challenged by Streptococcus suis. The results showed that petechia and ecchymosis could be seen on the skins of auricle, neck and abdomen, and at the end of limbs in dead pigs. Severe congestion and hemorrhage lesions were observed in many organs. Hemorrhagic spot upheaval and hemorrhage infarcted area were seen on the surface of spleen. There were sawtooth processus on the edge of spleen and slight processus on the section. Joint swollen, yellow exudation in the articular cavity and fibrinoid osteoid vegetation in the glenoid fossa after incision also were the dominant features of this disease. Hemorrhage in various degree and neutrophils infiltrate in internal organs could be seen, besides other particular pathology could be seen in each organ.

Key words: Streptococcus suis; pathological anatomy; histology observation

猪链球菌病是由多种不同群的链球菌引起的传染病。该病在临床上有多种类型, 主要表现为败血症型、脑膜炎型、关节炎型、淋巴结脓肿型四大类症状。该病分布范围极广, 世界各地均有发生, 在我国许多地区该病呈上升的趋势, 在某些地区甚至造成较大规模的流行, 是持续困扰养猪业的主要传染病之一。

猪链球菌病的流行虽无明显的季节性, 一年四季均可发生, 但以7-10月份易出现大面积流行^[1]。它是猪的一种常见传染病, 而且可感染特定人群发病, 并可致死亡, 危害严重。猪链球菌病的症状以淋巴结脓肿最为常见, 但以急性败血症型危害最大。目前发现的急性猪链球菌病的主要病原是C型链球菌, 它含有一种特异性的多糖抗原, 这种引起疫

病的物质位于C物质外层, 又称表面抗原^[2]。在此, 本文主要通过实验描述猪链球菌病的肉眼观察病变和组织学变化, 提供有诊断价值的科学参考资料。

1 材料与方 法

1.1 材料来源 实验动物为湖南农业大学兽医院的3头8月龄猪, 链球菌C群马链球菌兽疫亚种是从宁乡县某猪场2006年夏秋之季暴发的“高热病”病猪上分离得到, 由湖南农业大学动物医学院病原微生物检测实验室鉴定, 病理实验室保存。

1.2 实验方法 三头8月龄猪用保存的猪链球菌攻毒致病死亡, 无菌采集死亡猪的血液抹片, 肝脏、脾脏和肺脏病变部位触片, 革兰氏染色后光学显微镜下观察。

无菌采集的肝脏和脾脏接种羊血琼脂平板,进行细菌分离培养,37℃培养 36 h;同时接种营养肉汤培养基,37℃培养 24 h。分别涂片染色镜检。

采集病变明显、典型的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、颌下淋巴结和小肠各一份,按照常规病理学石蜡切片制作方法制作组织切片^[3,4],光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 血液涂片和组织触片观察 血液涂片和肝脏、脾脏和肺脏触片染色后的光学显微镜检查,均可见呈单个、成双或链状排列的革兰氏阳性近乎圆形或卵圆形的球菌,一般由 3~8 个球菌组成链状。

2.2 细菌培养特性 羊血琼脂平板均可见直径 0.1~1.0 mm、灰白色、表面光滑湿润,边缘整齐隆起的小菌落,菌落周围形成约 1 mm 透明的溶血环,呈典型的 β -溶血。同时取菌落涂片,革兰氏染色,镜检均可见单个、成双或短链状排列的革兰氏阳性球菌。营养肉汤培养基均混浊,管底有少许灰白色絮状沉淀物。涂片染色镜检,均可见单个、双球状或 3~8 个菌体构成链状的革兰氏阳性球菌,但以 5~6 个菌体构成的短链居多。

2.3 尸体检查 全身皮肤弥漫性出血,耳廓、颈下、腹下和四肢末端皮肤尤为明显,有紫红色出血斑点,从鼻孔流出暗红色血液,凝固不良,全身被毛杂乱,纠结成束。

2.4 病理剖检特征 心脏肿大,切开后可见血液凝固不全,心脏瓣膜纤维素样变性,心肌散布多个针尖大小的出血点,偶见坏死灶。肝脏肿大充血,边缘钝厚,质硬,被膜有纤维素样物质及数个直径为 3 cm 左右的圆形坏死灶,切面结构模糊不清。胆囊充盈,胆汁粘稠浓缩成胶样物质,胆囊壁增厚。脾脏明显肿大,色泽暗红,表面粗糙,有许多大小不一的出血点隆起突出,边缘可见“锯齿”样突起,有出血梗死区,切面略外翻,结构模糊不清。肺脏肿大,严重充血,表面颜色不均,呈现虾肉样实变,切开后可见流出大量含泡沫血液,切小块置于水中立即下沉。肾脏稍微肿大,表面散布零星出血点。脑肿大充血,脑膜表面出血点密布,内有积液,脑膜下水肿,大脑内部有梗死。肠体血管充盈,肠系膜淋巴结肿大,严重出血,粘膜和浆膜有零星出血

点。淋巴结肿大数倍,密布出血点,切开后可流出血液。关节肿胀,触之有波动感,切开后可见大量黄色渗出物,关节囊囊壁增厚,关节窝处可见骨骼样赘生物。

2.5 病理组织学特征 各个脏器的共同组织学变化是:组织不同程度出血,嗜中性粒细胞浸润。特征之处是:心肌组织结构破坏,闰盘消失,大量红细胞浸润,有炎性细胞浸润;肝小叶结构被破坏,索状结构消失,细胞核溶解,出现空泡样变性,枯否氏细胞浸润;脾脏可见大面积出血,嗜中性粒细胞浸润;血管外周、支气管外周及细支气管外周出现淋巴细胞套,支气管、细支气管和肺泡出血,肺脏实质性病变;肾小球出血,近曲小管和远曲小管管壁细胞核浓缩,胞浆红染呈丝状,炎性细胞浸润,髓质比皮质色深且界限不清;脑组织嗜中性粒细胞弥漫性浸润,脑膜和脉络膜从纤维蛋白渗出、水肿和细胞浸润,脉络膜丛的刷状缘破坏,脑室内可见纤维蛋白呈实质性病变,有纤维素性出血和间质纤维素性物质;小肠杯状细胞数目增多,中央乳糜管缩小,肠上皮细胞核碎裂,有溶解现象,粘膜下层有出血现象,肠腺细胞坏死情况严重;淋巴结红细胞浸润,淋巴小结鲜红色,副皮质区和髓质炎性细胞浸润,可见大量嗜中性粒细胞和单核-巨噬细胞,淋巴组织小血管的上皮细胞细胞核固缩,胞浆成网状,淋巴小梁结构破坏。

3 讨论

猪链球菌病的猪耳廓、颈下、腹下和四肢末端皮肤有紫红色出血斑点;全身大部分实质器官肿大、充血和出血^[5]。脾脏肿大和关节肿胀都是本病的示征性病复,表现为脾脏出血点隆起,边缘“锯齿”样突起,并有出血梗死区,切面略突出;关节肿胀,切开后可见大量黄色渗出物,关节窝处有纤维素质地的骨骼样赘生物。组织学方面脏器组织呈现不同程度出血,嗜中性粒细胞浸润^[5]。

C 群马链球菌兽疫亚种通常寄生在母猪的黏膜和皮肤,在代谢过程中产生一种透明质酸酶,该酶能分解结缔组织中的透明质酸,使结缔组织疏松,通透性增强,易于病菌在组织中扩散,很快进入淋巴管和淋巴结,然后冲破淋巴屏障,进入血液循环。由于病菌在繁殖过程中产生的毒素作用,使大量红细胞溶解,血液成分改变,血管壁受损和整个血液循环系统发生障碍,网状内皮系统的吞噬

机能降低,发生全身性败血症,最后导致各个实质器官严重充血、出血。尤其是富有网状内皮细胞的器官和组织,发生的病理改变更明显^[1]。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2001. 94-95.
[2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2006. 204-212.

- [3] 田欣田, 童文德, 邱震东. 现代动物病理学实验技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 87-130.
[4] 唐慕湘, 赵伦华, 曹书芬. 快速石蜡切片的制作新法[J]. 邵阳医学院学报, 2003, 22(5): 301.
[5] Zhao Rong Lun, Qiao Ping Wang, Xiao Guang Chen, et al. Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen[J]. The Lancet Infectious Diseases. 2007, (3): 201-209.
[6] 田云, 孙彦伟. 猪链球菌鉴定方法的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2006, 31(4): 6-9.

(上接第 15 页)

法分别对鸡鸭进行试验,研究发现,饲料中高水分导致食糜粘性更强,由于鸭对水分的吸收能力更好,从而减轻了食糜粘滞对生产性能的负面影响;③阶段差异:Yin 等^[12]报道,玉米小麦型日粮对家禽生产性能的影响呈现明显的酶和饲养阶段的交互作用,主要在家禽早期阶段效果更显著。在玉米小麦型日粮中添加酶制剂对 1-20 日龄双鬼头肉鸭生产性能是否有显著影响还有待进一步研究。

在本试验中,因检测条件限制,均未检测试验日粮中各种酶的活性,酶活性变化可能是导致本研究中生产性能无显著差异的原因之一;另外,对照所设磷水平偏高和本试验日粮中小麦用量还偏保守,日粮结构未能为酶作用的发挥提供更有利的环境,这可能也是正、负处理组间生产性能无显著性差异的重要原因。贺建华等^[13]研究报道,日粮中小麦含量越高,酶的作用越显著。因此,此添加量下的各种饲用酶制剂并未对 17-47 日龄双鬼头肉鸭生产性能和经济效益产生显著影响($P > 0.05$)。

5 结论

在本研究条件下,各种饲用酶制剂并未对 17-47 日龄双鬼头肉鸭总体生产性能和经济效益产生明显影响。其原因还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Anison G. Commercial enzyme supplementation of wheat based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolizable energy, starch and pentosan digestibilities in broiler chickens[J]. Anim Feed Sci Technol, 1992, (38): 105-121.
[2] Bedford M R, Classen H L. Reduction of intestinal vis-

cosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is affected through changes in carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and feed conversion efficiency of broiler chicks[J]. J Nutr, 1992, (122): 560-569.

- [3] Brenes A, Smith M, Guenter W, et al. Effect of enzyme supplementation on the performance and digestive tract size of broiler chickens fed wheat- and barley-based diets[J]. Poult. Sci, 1993, (72): 1731-1739.
[4] Hew L I, Ravindran V, Mollah Y, et al. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolizable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens[J]. Anim Feed Sci Technol, 1998, (75): 83-92.
[5] 王海英, 芮于明, 袁建敏. 小麦日粮中添加木聚糖酶对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 饲料研究, 2003, (12): 28-33.
[6] 高宁国, 韩正康. 米糠日粮添加粗酶制剂对肉鸭生长性能、消化和代谢机能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 1997, 33(3): 30-33.
[7] Hong D, Burrows H, Adeola O. Addition of Enzyme to Starter and Grower Diets for Ducks[J]. Poultry Science, 2002, (81): 1842-1849.
[8] Bedford M R. Mechanism of action and potential environment benefits from the use of feed enzymes[J]. Anim Feed Sci Technol, 1995, (53): 145-155.
[9] 俞路, 王雅倩, 章世元, 等. 复合酶制剂对肉鸭生产性能和养分消化率的影响[J]. 新饲料, 2008, (3): 34-36.
[10] Jamroz D, Eder K, Wiliczekiewicz A, et al. Digestibility of NSP-bound sugars in feeding triticale and enzymes to chickens, ducks and geese[J]. J Anim Physiol Anim Nutr, 1998, (79): 113-122.
[11] Scott M L, Dean W F. Nutrition and Management of Ducks [M]. M L Scott, Ithaca, NY. 1991, 233-362.
[12] Yin Y L, Baidoo S K, et al. Effect of enzyme supplementation on the performance of broilers fed maize, wheat, barley or micronized dehulled barley diets [J]. J Anim Feed Sci, 2000, (9): 493-504.
[13] 贺建华, 余有贵. 饲料中小麦比例与复合酶添加量对肉鸭生产性能的影响[J]. 中国饲料, 2004, (14): 10-12.

奶牛急性胃肠炎的诊治

刘瑞鑫, 黄 迺, 罗蒙和

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001)

中图分类号: S856.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0027-02

南宁市某奶牛场饲养 350 头奶牛, 2009 年 7 月 11 日开始有几头育成牛拉稀, 13 日起出现大面积拉稀现象, 16 日达到高峰, 全场奶牛除犊牛外, 全部拉稀, 但无死亡现象。经送检、临床诊断等综合判断, 诊断为由饲料中毒引起的急性胃肠炎。经积极治疗, 至 7 月 19 日病情得到有效控制, 粪便基本转好, 20 日除个别牛外, 基本痊愈。现将诊治过程报告如下:

1 发病情况及临床症状

7 月 12 日早上接到该场兽医报告: 11 日有几头育成牛拉稀, 12 日早上发现已蔓延至全栏。13 日发现, 部分产奶牛也开始出现拉稀现象, 14 日、15 日大面积增加, 16 日达到高峰, 全场奶牛全部拉稀。巡栏发现: 牛群食欲减弱, 不爱吃精料, 青草采食量也大幅度下降, 但饮水次数增加。部分牛只流出脓性鼻涕, 甚至带血, 但体温正常。运动场上牛粪稀烂, 有些为水泻粪, 恶臭; 有少量血粪且粪中带黏液。巡栏还发现, 有个别奶牛肛门、阴门水肿。产奶牛泌乳量下降明显。

2 诊断与治疗

根据牛群的发病情况和临床症状及两次送检均无发现寄生虫等异常情况, 初步诊断为急性肠炎, 牛群大面积爆发的情况及检查饲料原料、配方等综合结果, 进一步诊断为急性胃肠炎。

12 日接诊后, 即采取治疗措施, 13 日产奶牛发病后, 疑为饲料质量问题, 我们即刻检查饲料配方, 饲料原料, 同时采样送检, 并适时调整原先配方, 暂时停加菜粕、棉粕。

初期牛群发病少时, 每头内服磺胺脒 30 片 \times 0.5 g/片, 同时肌注硫酸黄连素 30 mL 或硫酸庆大霉素 25 mL 或容大胆素(岑连注射液) 30 mL, 每天 2 次。14 日起, 由于牛群发病增加, 且有大面积

流行的迹象, 我们调整了治疗方案: 不再内服磺胺脒, 全部改为肌注的方法, 并分为三组: 一组肌注硫酸庆大霉素 25 mL/头, 一组肌注容大胆素 30 mL/头, 另一组肌注硫酸黄连素 30 mL, 同时全场消毒, 水池重新换水并加入消毒剂。15 日, 最先拉稀的牛只出现好转, 但到了 16 日, 又出现新发病例。至此, 全场奶牛全部拉稀。在牛群饮水方面也作了调整, 一部分牛群饮服加入克毒灵(主要成分二氯异氰脲酸钠, 严格按说明配制)的消毒水, 另一部分牛群饮服 5% KMnO_4 消毒水(其中加入 0.9% NaCl)。由于容大胆素的效果不太明显, 原先注射容大胆素的改为肌注硫酸黄连素 30 mL + 青霉素 320 万 IU。18 日全场再一次应用生石灰消毒。19 日早上发现, 除少部分牛仍拉稀外, 其余基本停止, 病情得到有效控制。20 日除个别牛外, 基本痊愈, 牛群采食正常, 产奶量也逐渐回升。拉稀牛继续每天用药 2 次, 直到痊愈。

对于流脓涕带血的牛只, 我们再辅于输液治疗: 生理盐水 500 mL, 5% 葡萄糖液 500 mL, V_C 50 mL, V_{B1} 50 mL, 安钠咖 10 mL, 止血敏 20 mL, 氨苄西林 0.5g \times 5 支, 连用 2 次, 情况明显好转。对拉血粪牛, 内服磺胺二甲嘧啶 30 片 \times 0.5 g/片, 连用 2 天, 首服加倍。

3 讨论与小结

3.1 此次某奶牛场爆发大面积急性胃肠炎, 正值三伏天中的第一伏, 天气炎热, 估计该病的爆发与天气有一定的关系, 因此夏天一定要做好奶牛的防暑降温工作。

3.2 奶牛急性胃肠炎多是由于饲养管理不当, 吃了发霉、变质的饲料, 或误食有毒的饲草所引起。从我们送检的饲料样品检测发现, 饲料中含有棉酚、植酸等有毒物质, 而饲料配方中却没有添加脱

酶剂。后查阅记录发现,在奶牛群发病前两天刚更换饲料配方,而所使用的棉粕是一年前购进的。因此,饲料配方一定要科学合理,在饲料原料上一定要严把质量关,选好、进好原料,并随时检查饲料的质量,发现发霉、变质,即刻停用。棉粕、菜粕等原料一定要经过脱毒处理才能使用。

3.3 奶牛急性胃肠炎的治疗,要做到早发现,早诊断,早治疗,对症下药。我们发现硫酸庆大霉素、硫酸黄连素对奶牛急性胃肠炎有比较明显的疗

效,硫酸黄连素再加上青霉素,效果更佳。

3.4 根据奶牛急性胃肠炎的发病情况,要适时进行全场的消毒处理,并保持清洁的饮水,可在水池中加入适量的消毒剂如克毒灵或百毒杀,或给予口服 5‰KMnO₄+0.9%NaCl 的混合消毒水。

3.5 奶牛急性胃肠炎的爆发有一定的环境条件,因此平时一定要做好预防,加强饲养管理,定期消毒场地,并保持清洁的饮水。只要做到科学饲养、规范化生产,便可杜绝本病的发生。

(上接第 20 页)

表 3 孵化温度参数表

室温℃	16~18	19~20	21~22	23~24	25~26	27~28	29~30	31~32	33~34
孵化温度℃	37.5	37.4	37.3	37.2	37.1	37.0	36.9	36.7	36.5

物。孵化湿度的控制也很重要,孵化 1~9 d 龄时,机内相对湿度为 65%;10~27 d 龄时,机内相对湿度控制在 50%;28~31 d 龄时,机内相对湿度为 70%;出雏时湿度大,蛋壳与空气中 CO₂ 作用,使蛋壳变脆,有利于出雏。(3)定时翻蛋和喷水晾蛋。机孵设定每 2 h 自动翻蛋一次,翻转角度以 110° 为宜,翻蛋可使胚蛋受热均匀,防止胚胎等与壳膜相连,保持正常胎位,促进胚胎运动,改善羊膜血循环,有利于出雏。鹅胚蛋在入孵至第 10 d 后,必须喷水(用温水)晾蛋,每次喷水晾蛋时应视当时室温控制在 5~10 min (喷水晾蛋操作规程如表 4)。(4)照蛋查胚,做好出雏工作。入孵后第 5 d 照蛋剔除光蛋(未受精蛋),入孵后第 15 d、第 27 d 时,照蛋查胚,剔除死胚蛋,在孵化至第 29 d 时,将鹅胚蛋上摊床,准备出雏,保持有充足的新鲜空气和适宜的温湿度。刚出壳的雏鹅,绒毛未干,须放置在盛有干草的箩筐中直至绒毛干燥,期间注意雏苗的密度,防止挤压而致弱雏死亡。还需防止温度过高、过低^[10]。

表 4 喷水晾蛋操作规程

日龄	晾蛋次数	时间分布
10~15	1	中午 11:00
16~20	2	中午 11:00,下午 5:00
21~27	3	早上 6:00,中午 11:00,下午 5:00
28~31	4	早上 6:00,中午 11:00,下午 5:00,晚上 11:00

3 结束语

在生产工作中,影响种鹅的产蛋量、受精率和孵化率的问题仍很多。如利用短光照改变马岗鹅的繁殖季节及提高产蛋量时,生产中还缺乏成熟的配套技术;人工授精技术还未在生产中推广;至今还没有鹅的饲养标准;政府对鹅的基础研究的经费投入过少,未能建立良种繁育体系。这些都制约着马岗鹅生产的发展,也是影响马岗鹅繁殖生产的主要问题。

参考文献:

- [1] 周广福,赵仙仔. 鹅的繁殖障碍与对策[J]. 养禽与禽病防治, 1995, (2): 22-23.
- [2] 周广福. 再论鹅的繁殖障碍与对策[J]. 养禽与禽病防治, 1997, (12): 12-14.
- [3] 黄运茂,施振旦,李孝伟,等. 光照对马岗鹅季节性繁殖活动和内分泌的调控[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(1): 29-36.
- [4] 朱基美,施振旦,郑诚. 广东鹅繁殖特性及其控制技术探讨[J]. 广东禽讯, 1996, (5): 11-15.
- [5] 鄢清. 浅谈提高母鹅产蛋量应注意的三个环节[J]. 江西饲料, 2009, (1): 45.
- [6] 曹同德,季作善. 提高雏鹅成活率的措施[J]. 农业知识(科学养殖), 2009, (7): 18.
- [7] 邓玲姣,邹知明. 提高种鹅产蛋量的技术措施[J]. 广西农业科学, 2000, (5): 256-257.
- [8] 吴长勇,汤建平. 产蛋鹅的饲养管理技术[J]. 现代农业科技, 2008, (21): 247.
- [9] 德晓艳. 种鹅休产期饲养管理[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008, (11): 72.
- [10] 彭祥伟,黄勇富. 影响种鹅蛋孵化的因素与调控[J]. 中国草食动物, 1999, 1 (6): 46-47.

猪轮状病毒 GD1 株 VP7 基因的克隆及序列分析

田小艳, 孙 华, 邓雨修, 苏润环, 王东东, 宋延华*

(广东省温氏集团研究院, 广东 新兴 527400)

摘要: 参考 GenBank 中发表的 PRV OSU 毒株 VP7 基因核苷酸序列 ORF 两端保守区序列, 设计 1 对特异引物, 以 PRV GD1 株反转录 cDNA 为模板, 通过 PCR 方法扩增出长约 1 kb 的基因片段, 并克隆到 pMD18-T 载体中进行序列测定。测序结果表明: VP7 基因全长 1 062 bp, 含有一个 981 bp 的开放阅读框, 编码 326 个氨基酸。与国内外已知的 13 个毒株 VP7 全长基因的核苷酸及推导的氨基酸序列比较, 相似性分别为 77.4%~100%和 78.6%~99.7%; 核苷酸系统发育进化树结果表明, GD1 毒株与轮状病毒 A2, JP3-6 毒株亲缘关系较近, 为一个进化群。

关键词: 猪轮状病毒; VP7 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0029-03

Clone and sequence analysis of VP7 gene of porcine rotavirus strain GD1

Tian Xiaoyan, Sun Hua, Deng Yuxiu, Su Runhuan, Wang Dongdong, Song Yanhua*

(Guangdong Win's Group Academy, Xinxing 527400, China)

Abstract: A pair of primers targeted the conserved region flanking the ORF of VP7 gene of porcine rotavirus (PRV) strain OSU were designed according to the published sequences. The PCR product of approximately 1kb long was amplified from cDNA of PRV strain GD1. The PCR product was cloned into pMD18-T vector and sequenced. The full-length of VP7 gene was 1062 bp long including a coding region of 981bp, which encoded a protein with 326 amino acids. The VP7 gene of the PRV strain GD1 shared 77.4% to 100% nucleotide homology with that of other 13 PRV strains. The amino acids of VP7 gene of the PRV strain GD1 shared 78.6% to 99.7% amino acids homology with that of other 13 PRV strains. The results showed that the strain GD1 was more close to strains A2 and JP3-6.

Key words: Porcine rotavirus (PRV); VP7 gene; clone; sequence analysis

轮状病毒 (Rotavirus, RV) 是呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 轮状病毒属 (Rotavirus) 的成员, 是各种幼龄动物病毒性腹泻的主要病原之一^[1]。猪轮状病毒病是一种人畜共患病, 在猪群中感染率很高, 仔猪被 RV 感染后, 机体免疫力急剧下降, 从而诱发多种腹泻病原体混合感染, 导致仔猪死亡率上升, 或生长缓慢、停滞^[2,3]。

PRV 病毒粒子表面有 3 种抗原, 即群抗原 VP6、中和抗原 VP7 及血凝素抗原 VP4。VP7 蛋白是病毒外壳的主要糖蛋白和主要中和抗原, 组成病

毒外壳的光滑部分; VP7 是一种 N- 联低聚甘露糖糖蛋白, VP7 是 PRV 的外衣壳蛋白, 也是一种糖基化蛋白, 由 326 个 aa 组成, 因不同毒株而异, 分别由 7 或 8, 9 基因编码, 为病毒外膜主要中和抗原, 决定病毒的血清型, 与病毒的毒力及免疫保护性相关, 也是划分血清型的主要标志^[4-6]。目前, 对 VP7 的研究比较多, 但由于其空间构象复杂, 排列规律不很明显, 给疫苗的研制带来较多困难, 在很大程度上阻碍了 PRV 的预防和治疗。本研究对广东省分离到的一株猪轮状病毒 GD 毒株 VP7 蛋白

基因进行分析,借以了解 GD 毒株 VP7 基因的分子特性以及与其他毒株间的关系,为探索该病毒的起源、分子流行病学特征和抗原变异规律提供依据,为进一步开展 RV 疫苗、诊断、预防等研究奠定生物学基础。

1 材料和方法

1.1 病毒 猪轮状病毒为本实验室从广东某规模化猪场分离获得,病毒经 MA104 细胞培养,第 6 代毒用于本研究。

1.2 载体与菌株 pMD18-T 购自 Takara 公司,大肠杆菌(JM109)本实验室保存。

1.3 试剂和工具酶 Trizol 试剂盒购自大连宝生物工程有限公同;DNA 胶回收试剂盒、质粒快速提取试剂盒均购自美国 Omega Bio-tek 公司;DNA Marker 为北京鼎国生物技术有限公司产品。

1.4 引物 根据 GenBank 中 PRV 核苷酸序列设计 1 对 VP7 片段扩增引物:

VP7F: 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC-3'

VP7R: 5'-GGTCACATCATACAATTCTAAT-3'

引物由上海生物工程有限公司合成,为冻干品,用时加适量灭菌超纯水溶解,分装(20 μL/管),-20℃保存备用。

1.5 轮状病毒 VP7 基因的扩增 按 Trizol 试剂盒说明的方法,从病毒培养液中提取病毒基因组 RNA,按 10 μL 反转录体系进行反转录。RT-PCR 反应体系为 25 μL:Premix Taq (DNA 聚合酶,Mg-Cl₂, 缓冲液,dNTP 混合物)12.5 μL,10 pmol/L 上、下游引物 1 μL,模板 cDNA 2 μL,加去离子水至 25 μL,混合均匀,同时设立阴阳性对照。PCR 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 45 s,49℃退火 45 s,72℃延伸 1 min 的程序,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物克隆与鉴定 将 VP7 的 PCR 产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳,切下约 1 000 bp 的目的条带,用凝胶回收纯化试剂盒回收目的片段,克隆到 pMD18-T 载体,具体操作程序见参考文献^[7],构建 pMD-VP6 重组质粒,连接产物转化 JM109 感受态细胞,菌液涂布在含 100 μg/L Amp 的 LB 平板上,37℃培养 16~18 h,挑取白色菌落培养后抽提质粒,进行 PCR、酶切鉴定后送上海博亚公司

进行测序。

1.7 RV VP7 基因序列的相似性比较 用 Blast 和 DNASTar 软件对 GenBank 中 13 株 PRV 的 VP7 全基因序列进行相似性比较,并绘制基因系统发育进化树。

2 结果

2.1 目的基因的扩增 从细胞毒中提取病毒 RNA,用 RT-PCR 的方法扩增 VP7 基因,PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 000 bp 左右特异性的目的条带,大小与预期结果一致(图 1)。

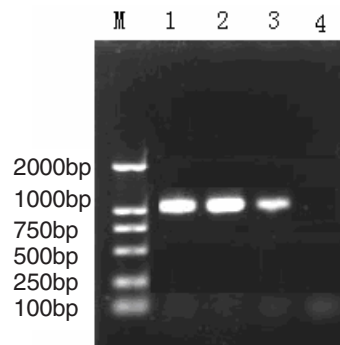


图 1 RV VP7 基因 PCR 产物凝胶电泳分析结果
M: DNA 分子质量标准; 1、2: 样品; 3: 阳性对照; 4: 阴性对照

2.2 重组质粒 pMD18-T-RV7 鉴定结果 将 VP7 的回收产物与 pMD18-T 载体连接,构建了 pMD18-T-VP7 重组质粒。将重组质粒进行 Hind III 和 Kpn I 双酶切鉴定,出现长度约 1 000 bp 和 2.7 kb 的片段;同时 PCR 也扩增出 1 000 bp 的目的片段与预期结果相符,证明重组质粒 pMD18-T-VP7 构建成功(图 2)。

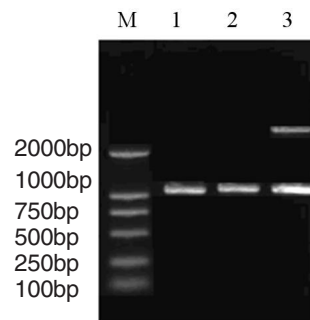


图 2 pMD18-T-VP7 重组质粒鉴定结果
M: DNA 分子质量标准; 1: Hind III 和 Kpn I 酶切鉴定; 2, 3: 重组质粒 PCR 鉴定

2.3 VP7 基因的核苷酸序列测定以及与其他毒株的相似性分析 对重组质粒进行序列测定, 经比较分析证明获得了 RV VP7 蛋白的全长基因, 共 1 062 bp, 含有一个 981 bp 的开放阅读框, 编码 326 个氨基酸。

选取 GenBank 上具有代表性毒株的 PRV VP7 全基因序列进行相似性比较。结果显示(图 3、图 4), GD 毒株与已发表的 13 株国内外毒株序列核苷酸的相似性在 77.4%~100%之间, 其中与 A2 株的相似性最高为 100%, 与 134-15 株的相似性最低为 77.4%; 氨基酸的相似性在 78.6%~99.7%之间, 其中与 A2 株的相似性最高为 99.7%, 与 0-1 株的相似性最低为 78.6%, 与各毒株氨基酸的相似性整体高于核苷酸的相似性。用 DNASTar 软件绘制氨基酸系统发育进化树, 在遗传进化关系方面, GD1 分离株与 A2 株更为接近(图 5)。

3 讨论

VP7 糖蛋白是 PRV 的主要免疫保护性抗原, 刺激机体产生中和抗体, 在消除感染中起着重要

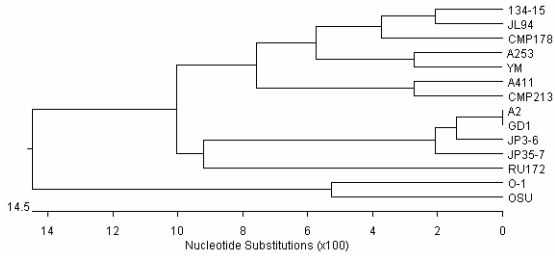


图 5 猪轮状病毒株系统发育进化树

作用。因此, 有关 VP7 基因的研究对以后 VP7 蛋白表达、诊断抗原、预防和控制 RV 引起的疾病都具有重要意义。

本研究选用了 PRV GD1 毒株对 VP7 全基因序列进行核苷酸和氨基酸相似性比较, 证明 GD1 毒株与其它毒株核苷酸的相似性在 77.4%~100%之间, 氨基酸相似性在 78.6%~99.7%之间, 发现 GD 毒株与其它毒株氨基酸的相似性比核苷酸的相似性整体要高 2.1%~9.5%, 说明在收集的核苷酸序列中都存在一定数目碱基的无意义突变。GD1 与 A2 株的氨基酸相似性最高, 为 99.7%, 由此预测 GD1 毒株的血清型与 A2 株的血清型相同为 G9 型。这为我国猪轮状病毒感染的流行病学调查和免疫预防提供了理论资料。GD1 株与 A2 株其他基因的相似性如何还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997. 456-466.
- [2] 宣长和, 孙福先, 朱战波, 等. 猪病学[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003. 29-32.
- [3] 张洪英, 高艳, 刘立亏, 等. 猪轮状病毒研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007, 3(6): 4-5.
- [4] 苏琦华. 轮状病毒蛋白的作用[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(2): 299-300.
- [5] Cook SM, Glass RI, Lebanon CW. Global seasonality of rotavirus infections[J]. BuII WHO, 1990, (68): 171-177.
- [6] Desselberger U, Mccrae M A. The rotavirus genome[J]. Microbiology immunol, 1994, (185): 31-60.
- [7] 丁萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Divergence	1	■	77.4	83.3	76.4	87.0	78.1	91.9	77.1	77.3	73.3	72.8	73.7	81.4	77.4
	2	27.2	■	77.2	77.0	77.5	79.2	77.5	94.0	93.3	75.8	75.9	76.4	78.1	100.0
	3	19.3	27.4	■	75.8	81.5	78.1	84.5	77.1	77.0	73.8	72.9	74.4	86.1	77.2
	4	28.7	28.0	29.6	■	76.2	85.7	77.8	76.4	77.3	73.5	73.5	75.8	75.9	77.0
	5	14.7	27.1	21.6	28.9	■	77.0	87.5	77.3	77.0	72.1	73.2	74.1	80.5	77.5
	6	26.1	24.7	26.3	16.3	27.8	■	77.9	77.8	79.0	74.3	74.8	75.4	77.8	79.2
	7	8.7	27.1	17.7	26.6	14.0	26.5	■	77.2	76.9	73.8	74.1	74.5	81.9	77.5
	8	27.7	6.4	27.6	28.9	27.4	26.8	27.6	■	92.9	74.6	75.5	75.6	78.3	94.0
	9	27.4	7.2	27.8	27.4	27.9	25.0	28.0	7.7	■	74.8	75.0	77.2	78.0	93.3
	10	33.4	29.4	32.5	33.3	35.5	32.0	32.6	31.3	31.0	■	84.2	72.4	72.8	75.8
	11	34.3	29.3	34.0	33.3	33.6	31.1	32.1	29.9	30.7	18.5	■	70.9	73.2	75.9
	12	33.0	28.8	31.6	29.4	32.3	30.2	31.6	29.9	27.5	34.9	37.5	■	74.4	76.4
	13	21.5	25.9	15.4	29.1	22.8	26.5	21.0	25.6	26.1	34.2	33.5	31.8	■	78.1
	14	27.2	0.0	27.4	28.0	27.1	24.7	27.1	6.4	7.2	29.4	29.3	28.8	25.9	■

图 3 不同 PRV 毒株 VP7 基因相应核苷酸的相似性比较

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Divergence	1	■	83.2	89.6	84.4	93.0	86.9	95.7	82.6	82.0	73.7	74.9	78.0	87.8	83.2
	2	18.8	■	84.4	85.6	83.5	87.8	83.2	96.9	95.4	78.6	78.9	82.6	84.4	99.7
	3	10.9	17.2	■	85.3	89.3	87.5	90.8	84.4	83.5	74.0	75.8	79.5	94.2	84.4
	4	17.2	15.7	16.1	■	85.6	94.5	84.7	85.6	85.3	76.5	76.5	80.4	84.7	85.6
	5	7.1	18.4	11.3	15.7	■	86.5	82.4	83.8	82.6	73.7	74.3	79.2	88.1	83.5
	6	14.2	13.1	13.4	5.4	14.5	■	86.5	87.5	87.2	77.1	78.0	81.0	87.2	87.8
	7	4.1	18.8	9.5	16.8	7.6	14.5	■	82.3	82.0	73.7	75.2	79.2	89.0	83.2
	8	19.6	2.8	17.2	15.7	18.0	13.4	20.0	■	96.0	78.6	79.5	83.5	84.4	96.9
	9	20.4	4.4	18.4	16.1	19.6	13.8	20.4	3.8	■	78.0	79.5	84.1	84.1	95.4
	10	32.1	24.9	31.6	28.0	32.1	27.1	32.1	24.9	25.8	■	89.9	71.9	74.0	78.6
	11	30.2	24.5	28.9	28.0	31.1	25.9	29.9	23.7	23.7	10.5	■	72.5	75.8	78.9
	12	25.8	19.6	23.7	22.4	24.1	21.6	24.1	18.4	17.6	34.9	34.0	■	79.2	82.6
	13	12.7	16.9	5.4	16.5	12.4	13.5	11.3	16.9	17.3	31.3	28.5	23.7	■	84.4
	14	18.8	0.0	17.2	15.7	18.4	13.1	18.8	2.8	4.4	24.9	24.5	19.6	16.9	■

图 4 不同 PRV 毒株 VP7 基因所编码氨基酸的相似性比较

猪繁殖与呼吸综合征病毒河北地方株 ORF3 基因的克隆及变异分析

王 娇, 赵泽坤, 王 坤, 孙继国
 (河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 从河北唐山分离到一株疑似猪繁殖与呼吸综合征病毒, 接种 Marc-145 细胞, 经过 4 代盲传后, 出现细胞病变, 经鉴定为 PRRSV, 命名为 TS 株。根据 GenBank 公布的 PRRSV JXA1 株 ORF3 基因的核苷酸序列, 设计并合成一对特异性引物, 用 RT-PCR 方法扩增完整 ORF3 基因, 将扩增产物连接到 pMD19-T 载体并转化克隆菌, 将阳性重组质粒 pMD-GP3 进行序列测定与分析。应用 DNA Star 软件, 将测序结果与国内外已发表野毒株和疫苗株的 ORF3 基因进行序列比较, 并绘制系统进化树。这为研制 PRRSV 新型疫苗及诊断试剂奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; TS 株; ORF3 基因; 变异分析

中图分类号: S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0032-03

Clone and variation analysis of ORF3 gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus strain TS isolated form Hebei district

Wang Jiao, Zhao Zekun, Wang Kun, Sun Jiguo

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: One PRRS virus strain TS was isolated from pigs of Hebei Tangshan after inoculated to Marc-145 cell. The full-length of ORF3 gene of PRRSV strain TS was amplified by RT-PCR with a pair of specific primers designed according to the ORF3 sequence of PRRSV JXA1 strain, and then cloned into plasmid pMD19-T. The recombinant plasmid named as pMD-GP3 was sequenced and analyzed. The sequence was compared with that of other PRRSV strains in GenBank by using DNASTar software and the phylogenetic tree was drawn. It laid the foundation for further study for genetic engineering vaccine and diagnostic reagent for PRRSV.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; strain TS; ORF3 gene; Variation Analysis

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiration Syndrome, PRRS) 是近年新发现的一种由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的猪传染病。该病 1987 年在美国北卡罗莱纳州首先发现^[1], 1991 年荷兰首次从 PRRS 疑似病例中分离出一种定名为 Lelystad 的新病毒(LV), 并确定 LV 为 PRRS 的病原^[2,3]。1996 年郭宝清等^[4]首次从国内疑似 PRRS 感染猪群中分离出 PRRSV, 从而证实了本病在我国的存在。2006 年夏我国爆发的高热病确诊为 PRRSV 变异株感染, 涉及十几个省的 200 万头猪发病, 且造成 40 万头猪死亡, 给我国养猪业造成巨大损失, 已成为困扰当前世界养猪业健康发展的主要问题之一^[5], 故受到国内外学者的高度重

视, 对本病毒的研究也逐渐深入。

PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 15 kb。ORF3 含有 765 个核苷酸, 编码的糖蛋白 GP3, 含有 254 个氨基酸, 具有 7 个可能的糖基化位点^[6]。GP3 是 PRRSV 中变异程度较高的蛋白之一, 仅次于 GP5。在欧、美型毒株间推导氨基酸的相似率为 54%~60%, 其变异主要集中在 N-端。GP3 是否存在于病毒粒子中目前尚存在争议。GP3 蛋白羧基端有一个与病毒血清型有关的非中和抗原表位, 其可能引起病毒基因型抗原性的差异。一些研究表明, 尽管该蛋白含有线型抗原决定簇, 但针对它的抗体与中和作用无关。Persch 等^[7]报道用杆状病毒表达的 GP3 免疫甚至可诱导产生

收稿日期: 2009-08-19

基金项目: 河北省重大技术创新项目(07221008Z)

比用 E 蛋白免疫更高的保护作用。因此 GP3 诱导的保护作用也许与细胞免疫反应有关。GP3 可能与 PRRSV 在猪体内持续感染有关,但其结构与功能仍不明确。本实验分离到河北省唐山 TS 株,对其 GP3 蛋白进行了克隆及序列分析,为河北 PRRSV 的防制提供了科学依据,并为研制 PRRSV 新型疫苗及诊断试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞、载体与菌种 PRRSV TS 株由本实验室从唐山某猪场的送检病料中分离、鉴定、保存;Marc-145 细胞由瑞普(保定)生物制药厂馈赠;pMDTM19-T vector,Top10 菌株购自大连宝生物公司。

1.1.2 工具酶及试剂 DMEM 为 GIBCO 公司出品;新生牛血清购自杭州四季青公司;TRIZOL 总 RNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶、MarkerIII 等均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 中发表的 JXA1 株的基因组序列,用 Primer5 软件自行设计特异性引物,由北京三博远志公司合成,扩增完整 ORF3 基因序列。

P1:5'-AAAGCTTCACGATTTTCAGCA-3'

P2:5'-TCTGTGACATTGGCAGTGATG-3'

1.3 病毒的增殖 用 Marc-145 细胞按常规方法增殖病毒。

1.4 PRRSV M 蛋白基因片段的扩增 病毒悬液按 TRIZOL 一步法提取总 RNA。反转录条件:42℃ 1 h,95℃ 5 min;PCR 条件:94℃ 5 min;94℃ 45 s,51℃ 45 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 10 min。

1.5 PCR 产物的克隆及序列测定 将回收的 PCR 产物与 pMDTM19-T 载体连接,重组载体命名为 pMD-GP3,转化 Top10 感受态细胞。提取质粒进行 PCR 鉴定。阳性菌液送北京三博远志公司测序。

1.6 序列比较及变异分析 测序结果用 DNAs-tar 分析软件与多株 GenBank 上公布的 PRRSV 毒株 ORF3 基因的序列进行比较和变异分析,并绘制系统进化树。

2 结果

2.1 病毒分离 将过滤后的病料悬液接种于 Marc-145 细胞,盲传至第 4 代开始出现 CPE,在

36 h 出现约 70%的 CPE(见图 1)。

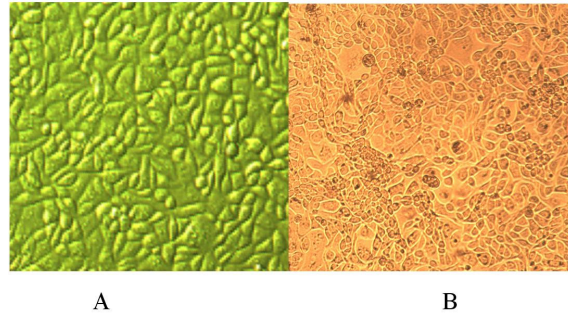


图 1 PRRSV TS 株在 Marc-145 细胞的病变

A: 正常的 Marc-145 细胞; B: 出现 CPE 的 Marc-145 细胞

2.2 PRRSV ORF6 基因的扩增 以 PRRSV TS 株总 RNA 为模板扩增出包括完整 ORF3 基因的片段的片段(见图 2)。

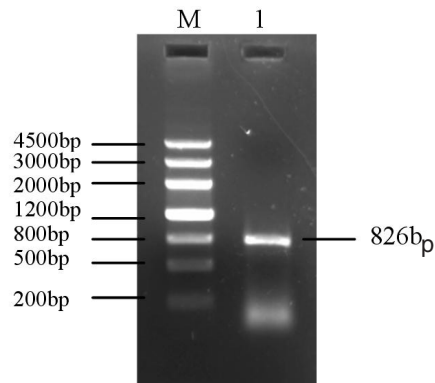


图 2 RT-PCR 扩增 TS 株 ORF3 基因结果

M: Marker III; 1: ORF3 基因片段

2.3 目的基因的克隆与鉴定 将扩增的各基因 cDNA 回收后克隆到 pMDTM19-T 载体,抽提质粒并进行质粒 PCR 鉴定,通过琼脂糖凝胶电泳分别得到约 2 kb 的 pMD 空载体和目的条带,结果与预期相符。

2.4 序列的测定 含重组质粒 pMD-GP3 的阳性菌液测序,获得 TS 株 ORF3 编码框序列,全长 765 bp,编码蛋白质的氨基酸数为 254 个。

2.5 氨基酸相似性分析 运用 DNAs-tar 分析软件对所获得的基因序列进行分析,与国内外发表的 PRRSV VR-2332、LV、CC-1、JXA1、HUB-2、GD、CH1-a、HB-1、HB-2、RespPRRS MLV 株相应 ORF3 基因序列编码氨基酸进行相似性分析。分析显示 TS 株与 LV 株氨基酸相似性为 61.0%,与 VR2332 株氨基酸相似性为 88.9%,TS 株属北美洲型毒株。

2.6 系统进化树分析 根据 PRRSV TS 株和 GenBank 中收录的欧美主要流行株 ORF3 核苷酸序列绘制系统进化树(图 3)。进化树表明, PRRSV TS 株与北美洲流行毒株关系较近, 属于美洲型。其中与 VR-2332、RespPRRS MLV、CC-1 关系较近, 属于同一个亚群, 而 HB-1、HB-2、CH-1a、GD、JXA1、HUB2 和 TS 株属于另一个亚群, 且 TS 株与高致病性代表毒株 JXA1 株关系非常近, 与欧洲流行毒株的亲缘关系较远。

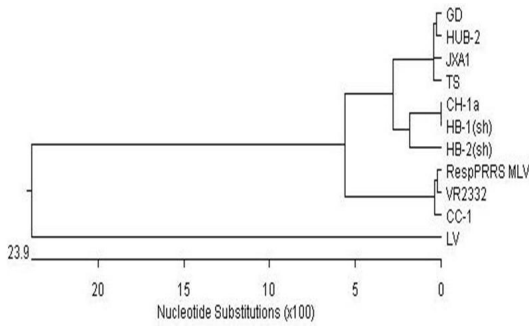


图 3 PRRSV ORF3 基因遗传进化树

3 讨论

河北省自 2002 年以来已有 PRRS 病的报道, 本研究从河北省唐山地区发病猪病料中分离出 PRRSV, 命名为 TS 株, 克隆了 PRRSV 的 ORF3 基因, 并对其进行了序列分析。通过与 LV 株和 VR-2332 株等国内外代表毒株的氨基酸的相似性比较, 发现此分离株与 VR-2332 株呈现较高的相似性, 相似性为 88.9%, 而与 LV 株存在较大差异, 相似性仅为 61.0%。同时又将 TS 株 ORF3 基因与国内各地区分离株进行比较, 均具有较高的相似性, 氨基酸的相似性基本上在 90% 以上, 其中与国内高热病代表毒株 JXA1 株的氨基酸相似性高达 99.2%。据此可以推测 TS 株属于美洲型。

不同毒株 PRRSV 具有不同的抗原性, 选择与当地流行毒株在抗原性上相关的种毒制备疫苗免疫是有效预防该病的关键。河北省近两年流行的毒株与高致病性蓝耳病疫苗所用毒株 JXA1 氨基酸相似性达 93.9%~96.7%, 主要结构蛋白 E、M、N 蛋白抗原表位区域极类似^[8]。笔者对 TS 株的 Nsp2 基因及其它结构基因序列也进行了扩增, 发现均

与 JXA1 株高度相似, 本实验也验证了 2007 年推出的高致病性蓝耳病灭活苗适用于河北省 PRRS 防治的说法。同时, PRRSV 具有抗体依赖性病毒增强作用和免疫抑制作用, 尽快研制开发更有效的新型疫苗, 是有效彻底地控制本病发生的当务之急。国内外的大量研究表明, PRRSV 的 ORF3 基因具有较强的免疫原性, 尤其在细胞免疫方面更具有优势^[9]。本研究为进一步研制表达 ORF3 基因的新型疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Stevenson G W, Van Alstine W G, Kanitz C L, et al. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1993, 5(3):432-434.
- [2] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands; the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, (13):121-130.
- [3] Terpstra C, Wensvoort G, Pol J M A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome(mystery swine disease) by infection with Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, (13):131-136.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1996, 87(2):1-5.
- [5] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of Fatal PRRSV Variants: Unparalleled Outbreaks of Atypical PRRS in China and Molecular Dissection of the Unique Hallmark[J]. 2007, *PLoS ONE*, 2(6):e526. doi:10.1371.
- [6] Meulenber J J M, Hulst M M, de Meijer E J, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome(PEARS), is related to LDV and EVA[J]. *Virology*, 1993, (192):62-72.
- [7] Persh S. Immune response for the ORF3 membrane protein of PRRSV[C]. *Proceedings 2nd International Symposium on PRRSV*. Copenhagen Denmark, 1995.
- [8] 陈赛娟, 刘涛, 孙继国, 等. 河北省猪繁殖与呼吸综合征病毒主要结构蛋白基因变异分析[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2009, 35(3):266-271.
- [9] 杨金雨, 仇华吉, 童光志. 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(5):28-31.

四味健蚕增茧液中白头翁的薄层鉴别

何绮霞¹, 曾 德², 甘承英², 吴景恩³

(1. 广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640; 2. 韶关市工业科学研究所蚕药厂, 广东 韶关 512026; 3. 广东药学院09届毕业实习生, 广东 中山 528458)

摘要: 采用薄层层析法(TLC)对四味健蚕增茧液中的白头翁药材进行鉴别,以硅胶G-CMCNa薄层板为固定相,氯仿-甲醇-水(70:30:10)作为展开剂,展开后喷10%H₂SO₄,105℃加热5~10 min显色,能较好地分离四味健蚕增茧液中的各种成分,从而对处方中的白头翁进行质量监控。本方法简便、准确,重现性好,专属性强,可对复方中的白头翁药材进行定性和半定量检查。

关键词: 薄层层析法; 白头翁; 四味健蚕增茧液

中图分类号: S859.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0035-02

Thin layer chromatography of radix pulsatillae in Si wei jian can zeng jian ye

He qixia¹, Zeng De², Gan Chengying², Wu Jing'en³

(1. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. The Silkworm Pharmaceutical Centre of Industrial Research Institute in Shaoguan, Shaoguan 512026, China; 3. Intern from Guangdong University of Pharmacy, Zhongshan 528458, China)

Abstract: Thin Layer Chromatography (TLC) was employed to detect the content of "Radix Pulsatillae" in Si wei jian can zeng jian ye, with silicon gel G-CMCNa plates as the stationary phase, chloroform/methanol/water (70:30:10) as the solvent, spraying 10% H₂SO₄ after separation and heated at 105 degree for 5-10 minutes to visualize the spots. This method could effectively monitor the "Radix Pulsatillae" content in Si wei jian can zeng jian ye. It was simple, specific, repeatable and suitable for qualifying and semiquantifying "Radix Pulsatillae" in mixture.

Key words: Thin Layer Chromatography (TLC); radix pulsatillae; Si wei jian can zeng jian ye

韶关市工业科学研究所蚕药厂研制的四味健蚕增茧液,由南板蓝根、白头翁^[1]、马齿苋、大蒜四味药组成,具有清热解毒,凉血止痢,消炎止痛,开胃促长的功能。白头翁是方中臣药,用于养蚕,主要抑制家蚕细菌性肠炎,协同南板蓝根抑制病毒生长,降低家蚕死亡率。

白头翁根含白头翁皂苷 A、B、C、D、23-二羟基- Δ^{20} (29)-羽扇豆烯-28-酸、白头翁皂苷 A3、B4、白桦脂酸-3- α -L-阿拉伯吡喃糖苷、白桦脂酸-3-氧代白桦脂酸、胡萝卜苷、白头翁素和原白头翁素^[2]。由于其成分复杂,中国药典及兽药典均未收载其薄层鉴别,文献报道也较少。为更好地控

制成方制剂的质量,本文摸索了比较理想的薄层层析鉴别方法。

1 材料及仪器

1.1 材料 供试品——四味健蚕增茧液(批号:080306;080402;080609)(由韶关市工业科学研究所蚕药厂提供)。白头翁对照药材(山东产,经广东省兽药与饲料监察总所鉴别为正品),硅胶G-CMCNa薄层板(山东青岛海洋化工厂生产),三氯甲烷、甲醇等(均为分析纯)。

1.2 仪器 分析天平,电热干燥烘箱。

2 方法与结果

2.1 硅胶板的制备 取硅胶G,加0.5%CMC-Na

收稿日期:2009-08-19

基金项目:广东省科技计划项目(2007B030801002)

(1:3)铺板(或者购置预制板),阴凉处晾干,120℃活化1 h,置干燥器中备用。

2.2 供试品溶液的制备 取四味健蚕增茧液制剂13 mL(相当于原药材2 g),用等量氯仿进行萃取,分取氯仿层溶液,然后置水浴中加热,浓缩至5 mL,作为供试品溶液,供点样用。

2.3 对照药材溶液的制备 称取白头翁对照药材0.1 g,加入70%乙醇5 mL,振摇20 min,过滤,取滤液浓缩至1 mL,作为对照药材溶液。

目前,国内法定的检测机构还没有白头翁的对照药材及相关的对照品供应。因此,本试验用经权威机构鉴定为正品的白头翁药材作为对照药材。

2.4 空白对照溶液的制备 白头翁阴性对照溶液:按照处方中各药材的比例,称取除白头翁外其它药材,按照四味健蚕增茧液的制备方法制备,可得空白对照溶液,再按2.2方法制备,得空白对照溶液。

2.5 层析条件 固定相:硅胶G-CMCNa 薄层板;展开剂:三氯甲烷-甲醇-水(70:30:10)下层溶液;点样量:6 μL;展距:15 cm;展开方式:上行;显色剂:10% H_2SO_4 (喷后先吹干再置烘箱105℃加热5~10 min)^[3]。

2.6 结果 供试品溶液⑥(四味健蚕增茧液)在与对照白头翁药材溶液①、②、③、④、⑤相同的位置上显相同颜色的斑点,而阴性(空白)对照溶液⑦在相应的位置上不显这些斑点。详见图1。

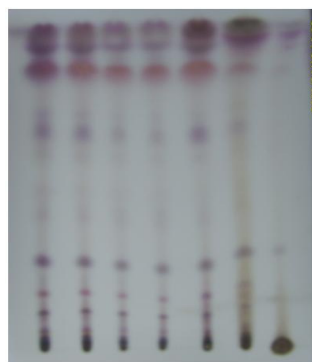


图1 白头翁薄层鉴别图谱

①、②、⑤:为山东白头翁药材;③、④:河北白头翁药材;
⑥:四味健蚕增茧液(蚕用),⑦:阴性(白头翁空白)对照液

2.7 重复性及重现性试验 按照上述2.5层析条件进行了多次重复性试验(同一实验室)及重现性(不同的实验室、不同的操作人员)试验,所得的斑点重现性比较好,Rf值变化不大。

3 讨论

3.1 改变展开剂的比例,如三氯甲烷-甲醇-水(60:40:10)^[4]、三氯甲烷-甲醇-水(65:35:10)、三氯甲烷-甲醇-水(70:30:10)、三氯甲烷-甲醇-水(70:35:10)、三氯甲烷-甲醇-水(75:35:10),但是展开效果不太理想,展开效果最为理想的是氯仿-甲醇-水(70:30:10)的下层液。因此选取展开剂的比例为:三氯甲烷-甲醇-水(70:30:10)的混合液为下层溶液。同时也选取上层(水层)作为展开剂展开,但展开效果不如下层三氯甲烷溶液。

3.2 考虑到石油醚能起脱脂作用,在用三氯甲烷萃取之前试过以石油醚萃取以脱脂,但其展开效果无明显改变,拖尾现象也无改善,因此没有增加该步骤。

3.3 在对照药材的提取时,震荡之前先将其超声处理20~30 min,或者先温浸1~2 h,最终结果也无太大变化,说明超声以及温浸处理对白头翁的提取影响不大。

3.4 用三氯甲烷萃取可以将不溶于氯仿的物质(例如糖类等)除去,由于该步骤可以除去的分层物质相对较多,说明本品中不溶于氯仿的物质相对比例较大,可使白头翁的薄层鉴别变好,因此该步骤可取。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 二部. 2005年版. 103-104.
- [2] 叶文才, 赵守训, 蔡皓, 等. 中药白头翁化学成分研究III[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(6): 337.
- [3] 关树光, 於文博, 赵宏峰, 等. 白头翁化学成分的研究(II)[J]. 长春中医药大学学报, 2006, (3): 45-46.
- [4] 肖培根, 李大鹏, 杨世林. 新编中药志[M]. 第一卷. 北京: 化学工业出版社, 2001. 328.

岗梅根醇提液对小鼠的半数致死量 (LD₅₀) 的测定

罗雅劲, 孙永学*, 曾绮雯, 郑少萍
(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 用寇氏 (k-rber) 法测定了岗梅根醇提液腹腔注射对小鼠的半数致死量 (LD₅₀), 结果显示, 岗梅根醇提液腹腔注射的 LD₅₀ 为 37 786.27 mg/kg, 95%可信限为 33 744.27~42 315.55 mg/kg。表明岗梅根醇提液属实际无毒级, 临床日用量安全。

关键词: 岗梅根醇提液; 半数致死量; 小鼠

中图分类号: S859.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0037-03

LD₅₀ of Gangmeigen extract Determined in Mice by ip injection

Luo Yajin, Sun Yongxue*, Zeng Qiwen

(Laboratory of Veterinary Phamacology, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642, China)

Abstract: Using Karber's method to test the LD₅₀ of Gangmeigen extract in mice by ip injection. Results showed that the LD₅₀ values in this experiment is 37 786.27mg/kg, with the 95% confidence limit of 33 744.27~42 315.55 mg/kg. Gangmeigen extract is a drug with real non-toxic level. The clinical daily dose of which is safe.

Key words: Gangmeigen extract; LD₅₀; Mice

岗梅根 (Roughhaired Holly Root) 是冬青科植物梅叶冬青 (*Ilex asprella* (Hook. f. et Arn.) Champ. ex Benth) 的根, 有清热解毒、活血生津等功效, 可用于治疗感冒、喉痛和跌打损伤等^[1]。国内外对该药的研究甚少, 目前没有该药急性毒性方面的研究报道。岗梅根醇提液是由笔者制备, 但该药应用于临床还需进行深入的药理毒理学评估。在前期研究的基础上, 本文进行了其半数致死量的试验测定。

1 试验材料

1.1 试剂和器材 岗梅根醇提液 (自制, 相当于每毫升药液含生药 1 g), 使用前, 分别配制成不同浓度; 注射器 (1 mL); METTLER 电子称; 其他试剂均为分析纯。

1.2 试验动物 健康 KM 小鼠 100 只, 雌雄各半, 体重 18~22 g。试验前, 将小鼠置 20~25℃ 空调动

物房中适应饲养 1 w, 标准饲料, 饮用水为自来水。

2 试验方法

2.1 预试 找出 0% (Dn) 和 100% (Dm) 估计致死剂量^[2,3]。取小鼠 25 只, 按性别分类后, 根据体重随机分成 5 组, 每组 5 只。禁食 24 h 后开始进行预试验。配制系列浓度的药液, 以 0.03 mL/g 的剂量对小鼠进行一次性腹腔注射, 连续观察 7 d, 每天观察 3 次, 记录动物死亡情况。根据观察结果, 在 5/5 和 1/5 致死组上下递增或递减, 假如某组死亡数为 5/5, 其前一组是 4/5 或 3/5, 则以该组剂量为 Dm; 假如前一组是 1/5 或 2/5, 则以该组剂量的 1.5 倍为 Dm; 同法, 找出 Dn。重复预试, 确定 Dm、Dn 分别为 67 500 mg/kg 和 27 648 mg/kg。

2.2 正式试验

2.2.1 分组及剂量计算 按照完全随机法, 分组常以 4~9 组为宜, 剂量比值 (1:K) 一般为 1:0.75~

收稿日期: 2009-10-19

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2007040635)

*: 通讯作者

0.8, 不宜超过 0.6~0.9 的范围。根据相关文献报道, 可按表 1^[4]来选择分组数及剂量比值。预试试验中, D_m=67 500 mg/kg, D_n=27 648 mg/kg, 查表以 K=0.8, N=5 (N 为分组数) 为适宜。从而可以计算各组剂量分别为: 第 1 组: 67 500 mg/kg; 第 2 组: 67 500 × 0.8=54 000 mg/kg; 第 3 组: 67 500 × 0.8²=43 200 mg/kg; 第 4 组: 67 500 × 0.8³=34 560 mg/kg; 第 5 组: 67 500 × 0.8⁴=27 648 mg/kg。

2.2.2 给药方案 将 50 只小鼠随机分成 5 组,

每组 10 只, 雌雄各半, 用苦味酸标记。试验前禁食 24 h, 正常给水。然后, 分别将各组小鼠按照 2.2.1 计算所得的剂量进行 1 次性腹腔注射, 注射完毕后, 将小鼠置 20~25℃ 空调动物房中饲养, 饲喂全价日粮。

2.3 观察指标 给药后, 连续观察 7 d, 详细记录小鼠死亡数目、时间及主要毒性反应。

2.4 统计方法 试验完毕, 统计各组小鼠死亡数, 计算死亡率 (p), 按孙氏改良寇氏公式^[2,4,6]<1>

表 1 选择分组组数及剂量比值简表

剂量比值 (1/K)	K 值	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.88	0.9
	2 倍左右	-	-	-	3~4 组	4 组	5~6 组	6~7 组	7~8 组
	3 倍左右	-	3~4 组	4 组	4~5 组	5 组	6~8 组	9 组	-
最高、最低致死量相差的倍数 (D _m /D _n)	4 倍左右	3~4 组	4~5 组	5 组	5~6 组	7~8 组	9 组	-	-
	6 倍左右	4~5 组	5~6 组	6 组	7~8 组	9 组	10 组	-	-
	10 倍左右	5~6 组	6~7 组	8 组	9~10 组	10 组	-	-	-
	14 倍左右	6~7 组	7 组	8~9 组	10 组	-	-	-	-

式计算 LD₅₀; lgLD₅₀ 的标准误按 <2> 式计算; LD₅₀ 的 95% 平均可信限按 <3> 式计算; 回归系数 (回归直线的斜率) 按 <4> 式计算; 回归方程式见 <5> 式; LD₁₀ 按 <6> 式计算。

$$LD_{50} = 10^{lg^{-1}[X_m - i \cdot (\sum p - 0.5)]} \dots <1>$$

其中: X_m 为最大剂量的对数; i 为相邻两组高剂量与低剂量之比的对数; p 为各组死亡率 (以小数字表示); Σp 为各组动物死亡率的总和。

$$lgLD_{50} \text{ 的标准误: } S_{x_{50}} = i \cdot \sqrt{\sum pq/n} \dots <2>$$

其中: n 为每组动物数; q=1-p。

LD₅₀ 的 95% 平均可信限 = LD₅₀ ± 4.5 • LD₅₀ • S_{x₅₀} ... <3>

回归系数 (回归直线斜率): b = (Y_h - Y_l) / (iR) ... <4>

其中: Y_h 是高半组 Y 值平均数; Y_l 是低半组 Y 值平均数; R 是 Y_h 与 Y_l 间相差的组距数。

$$\text{回归方程式: } y = bx + 5 - b \cdot lgLD_{50} \dots <5>$$

3 结果

3.1 小鼠中毒反应 从 5 组试验小鼠给药后的临床反应来看, 均出现呼吸困难、烦躁不安等症状, 死亡小鼠病死前症状更加突出; 死亡时, 出现乱蹦乱跳, 抽搐直至无力, 呼吸渐加深加快至死, 且有尸体僵硬, 出现强直症状。存活小鼠在给药

3 d 后恢复正常, 以后均未出现行为异常。各组小鼠死亡只数及死亡时间见表 2。

表 2 各组小鼠死亡只数及死亡时间表

组别	死亡数 (只)	死亡时间 (d)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	10	9	1	-	-	-	-	-
2	9	3	6	-	-	-	-	-
3	7	3	4	-	-	-	-	-
4	3	1	1	1	-	-	-	-
5	2	1	1	-	-	-	-	-

3.2 急性毒理参数 岗梅根醇提液半数致死量试验原始数据和计算资料见表 3。按表内数据, 可按照公式算出岗梅根醇提液 LD₅₀ 有关的全部数据。

$$LD_{50} = 37\ 786.27 \text{ mg/kg}$$

$$S_{x_{50}} = 0.025\ 08$$

LD₅₀ 的 95% 平均可信限 = 33 744.27 ~ 42 315.55 mg/kg

回归直线斜率:

$$b = 8.4546$$

回归方程式:

$$y = bx + 5 - b \cdot lgLD_{50}$$

$$\text{即 } y = 8.4546x - 33.699$$

表 3 岗梅根醇提液半数致死量试验原始数据和计算资料

剂量 (mg/kg)	死亡数	计算资料已知数据	组次	死亡率 (p)	P ²	Y	
67 500	10/10	Dm=67 500 mg/kg	1	1.0	1.00	6.88	
54 000	9/10	Xm=4.8293	2	0.9	0.81	5.88	Y ₁ =5.913
43 200	7/10	n=10	3	0.7	0.49	4.98	Y ₁ =3.455
34 560	3/10	N=5	4	0.3	0.09	3.66	R=3
27 648	2/10	i=0.09691	5	0.2	0.04	3.25	

注: Y 由查 GB15193 [1]. 3-2003 急性毒性试验: 反应率 - 概率单位表所得。

4 讨论

由于试验动物的抽样误差, 药物引起动物死亡的剂量大多在 50% 质反应的上下, 呈现正态分布。在急性毒性试验中, 50% 质反应即所谓半数致死量 (LD₅₀) [4]。在这样的质反应中药物剂量和质反应间呈 S 形曲线, 其两端处较平, 而在 50% 质反应处曲线斜率最大, 因此, 药物剂量稍有变动, 则动物的死或活的反应就会出现明显差异, 所以测定半数致死量能比较准确地反映出其毒性大小。半数致死量与毒性成反比, 即致死量越小, 毒性越大; 致死量越大, 毒性越小。

通过本次试验, 笔者测定了岗梅根醇提液经腹腔注射的半数致死量为 37 786.27 mg/kg, 其 95% 平均可信限为 33 744.27~42 315.55 mg/kg, 证明该药液属实际无毒级 [2], 可以安全应用于临

床。但在本次试验中, 小鼠由于适应饲养了 1 周, 体重普遍偏高, 这可能会造成测得的半数致死量偏大。

参考文献:

- [1] 刘柳淑, 陈华萍, 李卫群, 等. 岗梅根乙醇提取物的抗炎作用 [J]. 中药材, 2004, (7): 519-520.
- [2] 卫生部 GB15193. 3-2003 号公告. 急性毒性试验国标 [S]. 2003.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 166.
- [4] 周登高, 冉婧, 田淑琴. 复方秦皮提取液半数致死量 (LD₅₀) 的测定 [J]. 中国牧业通讯, 2008, (19): 38-43.
- [5] 陈杖榴. 兽医药理学 [M]. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2002. 9.
- [6] 史志诚. 动物毒理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001. 889-893.

中国诞生了执业兽医

2009 年农业部在吉林、河南、广西、重庆、宁夏等 5 个省(区、市)开展执业兽医资格考试试点工作。根据全国执业兽医资格考试委员会第三次全体会议确定的 2009 年执业兽医资格考试成绩合格分数线, 共有 5226 名考生取得执业兽医资格, 其中执业兽医师 1086 人, 执业助理兽医师 4140 人。近日, 农业部向通过执业兽医资格考试的考生核发了执业兽医师资格证书和执业助理兽医师资格证书。这标志着我国终于诞生了执业兽医。

执业兽医是指具备兽医相关技能, 依照国家规定取得兽医执业资格, 从事动物诊疗和动物保健等活动的兽医技术人员。执业兽医是我国新型兽医队伍的重要组成部分, 在国家兽医工作体系中发挥着重要作用。一方面, 执业兽医通过开展动物疫病预防、诊疗和咨询等服务活动, 减少因动物疫病引起的畜牧生产损失。另一方面, 执业兽医通常是动物疫情第一发现人或者报告人, 是疫情控制的主要力量, 在动物疫病防控中起着及时发现和报告疫情的前哨作用。

推行执业兽医制度, 是我国兽医事业与世界上多数国家和地区的通行做法, 是全面贯彻落实《动物防疫法》和《国务院关于推进兽医管理体制改革的若干意见》文件的重要举措。执业兽医的诞生, 将对提高兽医队伍整体素质和从业能力, 做好重大动物疫病防控, 保障畜牧业健康持续发展, 维护公共卫生安全发挥重要作用, 在兽医事业发展史上具有里程碑意义。

(信息来源: <http://www.cadc.gov.cn/>)

昆明小鼠内细胞团和滋养层细胞注入去核 2-细胞胚的核移植研究

彭礼繁^{1,2}, 赵 焕¹

1. 深圳市武警医院生殖医学中心, 广东 深圳 5180231; 2. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室, 辽宁 沈阳 110161

摘要: 采用核移植技术将单个细胞注入去核 2-细胞卵裂球中, 比较来自于囊胚的内细胞团 (ICM) 和滋养层细胞 (TE) 产生孕体或嵌合体的发育潜力。用 TE 和 ICM 重构胚胎的发育潜力, 主要取决于注射 hCG 后从输卵管收集到的 2-细胞胚胎的时间。在注射 hCG 后 38~42 h 和 43~46 h 收集得到的 2-细胞胚胎, 其重构胚胎仅仅能够发育到 4-细胞期。注射 hCG 后 48~51 h 收集得到的 2-细胞胚胎, 重构后发生卵裂的胚胎比率显著提高, 有少部分会发育到囊胚期。用诺考达唑 (Nocodazole) 处理这些重构胚, 发生卵裂的胚胎比率会显著提高, 并且有部分重构胚发育到囊胚阶段。将这些囊胚移植到受体鼠中, 在其妊娠中期未检测到供体核的出现。用 ICM 和 TE 进行重构得到的嵌合 2-细胞胚胎, 其体外发育潜力有限, 本试验中也未得到嵌合孕体。

关键词: 嵌合体; 核移植; 内细胞团; 滋养层细胞

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0040-03

Nuclear Transplantation of Mouse Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells into Enucleated Two-Cell Embryos

PENG Li-fan^{1,2}, ZHAO Huan²

(1.Reproductive Medicine Research Center, Shenzhen Border-control Police Hospital, Shenzhen 518023;2.Animal Embryo Engineering Laboratory, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161)

Abstract: Trophectoderm(TE) and inner cell mass(ICM) cells form blastocysts were compared for their ability to produce chimeric mice or conceptuses using nuclear transplantation in which a single cell was transplanted into an enucleated blastomere of a 2-cell embryo. The development ability of the embryos reconstituted with TE and ICM cells was depended on when the recipient 2-cell embryos were recovered after hCG administration. When 2-cell embryos obtained 38-42 and 43-46h post hCG injection were used, cell division of the reconstituted embryos rarely progressed to the 4-cell stage. However, when embryos recovered 48-51h post hCG were used, the proportion of cleaved embryos increased significantly, developing to blastocysts with several large blastomeres. When reconstituted embryos were treated with nocodazole after nuclear transplantation, the percentage of cleaved embryos significantly increased, with some developing to blastocysts. Such blastocysts were transferred to recipient females, and no donor nuclei were detected in the conceptuses at midgestation. The in vitro development ability of the chimeric 2-cell embryos reconstituted TE and ICM cells from blastocysts was quite limited and no chimeric conceptuses were obtained.

Key words: Chimerism; Nuclear transfer; Inner cell mass; Trophectoderm

哺乳动物胚胎在囊胚阶段能够分化出较为明显的细胞系, 如 TE 和 ICM^[1]。TE 是指在生殖系中出现的第 1 类细胞, 随后能够发育形成胎盘和胎膜。ICM 是指在生殖系中能够形成胚胎的细胞, 其细胞核具有发育全能性。当把这些细胞注入到囊

胚或 8~16 细胞胚中时, 能够形成嵌合体^[2]。目前还没有报道检测到 TE 细胞的发育全能性^[3]; 把 TE 细胞与 8~16 细胞胚聚集或者将它们注入到囊胚中时, 也不能获得嵌合体或受孕体。虽然, TE 细胞被认为已经失去了发育全能性, 但仍必要采用现

代生物学手段来检测它的发育全能性。核移植技术产生的嵌合胚,为评估 TE 和 ICM 的发育全能性提供了一个有效途径。Nakamura 等^[4]报道,由 2-细胞胚互换细胞核的同步化异体产生了嵌合体小鼠,表明来自非同步化胚胎的嵌合体能够发育到 8 细胞期。本试验通过把单个细胞注入到去核的 2-细胞胚的卵裂球中,以检测经核移植后 TE 和 ICM 的发育全能性,以及诺考达唑对重构胚发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 4~6 周龄雌性昆明(KM)小鼠,购自大连医科大学实验动物中心[合格证号:SCXK(辽)2008-0002]。除特别说明外,所用试剂均购于 Sigma 公司。

1.2 受体 2-细胞胚的收集 5~6 周龄的 KM 雌鼠用 5IU PMSG 和 5IU hCG(间隔 48 h)进行超排处理,并与 KM 公鼠交配。在注射 hCG 38~42 h、43~46 h 或 48~51 h 后,颈椎脱臼法处死雌鼠,用 M2 培养基从输卵管壶腹部冲出受体 2-细胞胚。

1.3 供体内细胞团和滋养层细胞的收集 5~6 周龄的 KM 雌鼠用 5IU PMSG 和 5IU hCG(间隔 48 h)进行超排处理,并与 KM 公鼠交配。在注射 hCG 68~72 h 后,颈椎脱臼法处死雌鼠,用 M2 培养基从输卵管壶腹部冲出胚胎。将这些胚胎在 M16 培养基中经 68~72 h,培养至囊胚阶段。为分离 TE 细胞,用 0.5%的链蛋白酶去除囊胚的透明带,用巴氏吸管吹打来分离囊胚细胞,从而得到 TE 和 ICM 细胞。TE 细胞在含 0.25%胰酶、200 IU/mL 胶原蛋白酶、100 IU/mL DNA 酶和 0.02% EDTA 的 PBS 中 4℃培养 30 min。然后,根据 Eyestone 报道的方法^[5],在 37℃追加培养 30 min,0.25%胰酶处理后,用巴氏吸管吹打分离 TE 细胞。ICM 细胞分离方法同 TE 细胞。

1.4 核移植和卵裂的同步化 把这些 2-细胞胚移入含 5 μg/mL 细胞松弛素(CB)的 M2 培养基中培养 15 min,在显微操作仪下用固定吸管固定胚胎,用实心细尖的玻璃针在透明带穿刺和划破做一小孔,用挤压的方法挤出含有卵核的少许胞质。本试验采用卵黄周隙内注射,用固定吸管吸住去核卵子,用注射吸管吸取已分离好的单个细胞,并沿去核时留在透明带上的切口插进去,将单个细

胞注射到卵黄周隙内,并保证供体细胞与胞质紧密地粘在一起,便于随后的融合。将注核的卵子置于细胞融合液(0.3 M 甘露醇 + 0.1 Mm MgCl₂ + 0.05 mM CaCl₂ + 0.5 mg/mL BSA 和 0.5 mM HEPES)中平衡 15 min,再放于充满电融合液的针式电极间进行电融合(ET-3 GOKU,Fujihira Industry)。使用电融合参数为 200 v/mm,60 μ sec,1 次,静止 1~2 min,用培养液洗涤后培养。培养 20~30 min 后检查细胞融合情况。将融合的重构胚放于 3 ng/mL 诺考达唑的 M16 培养基中继续培养 10~12 h,使每个卵裂球的卵裂都达到同步化。

1.5 重构胚的培养和移植 用 Nocodazole 处理后,用 M2 培养基将重构胚清洗数次,放于覆盖有石蜡油的 M16 培养基中,5%CO₂,37℃培养 24 h,检查这些重构胚的分裂情况。培养 2 天后,有少许胚胎会发育到囊胚阶段。最后,将这些囊胚移植到假孕雌鼠的输卵管中。

1.6 对妊娠中期嵌合体的分析 按 Eicher 等^[6]报道的方法,采用磷酸葡萄糖异构酶(GPI)来分析试验数据。同时,对妊娠 12.5 天的孕鼠处死后,对其胚胎、胎膜和胎盘进行数据分析。

1.7 数据分析 所得资料采用 SPSS11.0 统计软件进行显著性检验分析。

2 结果与分析

2.1 受体 2-细胞胚收集阶段和诺考达唑处理对重构胚发育的影响 由表 1 可知,当注射 hCG 38~42 h 和 43~46 h 后收集到的 2-细胞胚用于核移植的受体时,TE 细胞重构的胚胎分别有 2.3% 和 9.6% 发生卵裂。当注射 hCG 48~51 h 后收集到的 2-细胞胚用于核移植的受体时,发生卵裂的胚胎比率会得到显著提高(32.7%, $P < 0.05$),并且有少量的 TE 细胞重构胚发育到囊胚阶段(0~6.4%)。但是,在这些囊胚当中有少量的卵裂球没有出现致密化的排列。在注射 hCG 48~51 h 后收集到的 2-细胞胚与注射 hCG 38~42 h 和 43~46 h 后收集到的 2-细胞胚相比较,用 ICM 细胞重构胚胎的卵裂比率明显提高(20.0%比 6.9%, $P < 0.05$)。用 TE 细胞重构的 48 枚胚胎中有 24 枚胚胎发生了卵裂,在培养 4 h 后有 20 枚发生卵裂,有 6 枚发育到囊胚阶段。在 ICM 细胞重构的 58 枚胚胎中有 15 枚胚胎发生了卵裂,在培养 4 h 后有 1 枚发生卵

裂,有 4 枚发育到囊胚阶段。在所有的囊胚中,有部分胚胎的卵裂球没有出现致密化。用诺考达唑处理后的重构胚分裂到 4-细胞期的比率较处理组有明显的提高(TE 组:50.0% vs 32.7%;ICM 组:25.9% vs 20.0%, $P < 0.05$)。诺考达唑处理组与未处理组相比,无明显差异(TE 组:12.5% vs 6.4%;ICM 组:6.9% vs 2.0%, $P < 0.05$)。

2.2 将嵌合胚胎转移进入受体雌鼠体内所获孕体 GPI 的分析结果 由表 2 可知,TE 重构胚发育到囊胚阶段得到的孕体,有 3 个存活,7 个退化;ICM 重构胚发育到囊胚阶段得到的孕体,有 1 个存活,4 个退化。但是,在每一个孕体当中,都未检测到供体核的分布。

3 讨论

将小鼠囊胚的 ICM 细胞与致密化胚胎聚集或注入到囊胚中时,具有产生嵌合体的能力^[2]。当把 TE 细胞与 8~16 细胞胚聚合或注入到囊胚中时,

并没有获得嵌合体和孕体^[3]。本试验中,将单个细胞注入到去核的 2-细胞胚卵裂球中,来检测囊胚中的嵌合细胞,但未从 TE 细胞和 ICM 细胞重构胚中获得嵌合体。据报道,将 8-细胞胚中的单个细胞核移植到去核的 2-细胞胚卵裂球中,可获得嵌合体^[7]。本试验也说明了 ICM 细胞的全能性,主要是由于供体细胞与受体 2-细胞胚之间的发育不同步所致。但是,关于小鼠胎儿生殖细胞的发育全能性还没有得到证实^[7]。

用 TE 细胞和 ICM 细胞重构的 2-细胞胚,其体外发育率会受到限制,这主要是注射 hCG 后胚胎回收的时间不同所造成。注射 hCG 38~42 h 和 43~46 h 后收集到的 2-细胞胚用作核移植的受体时,很少观察到有重构胚发育到 4-细胞期(TE 组:2.3% vs 9.6%;ICM 组:0% vs 6.9%);当注射 hCG 48~51 h 后收集到的 2-细胞胚用于核移植的受体时,有较多的重构胚发生卵裂(TE 组:

表 1 受体 2-细胞胚收集阶段和诺考达唑处理对重构胚发育的影响

供体细胞	注射 hCG 后回收 2-细胞胚的时间 (h)	诺考达唑处理与否	重构胚胎数	
			卵裂率 (%)	囊胚率 (%)
TE	38-42	-	2.3 (1/43) ^{al}	0 (0/43) ^a
	43-46	-	9.6 (4/41) ^a	0.4 (1/42) ^b
	48-51	-	32.7 (16/49) ^b	6.4 (3/49) ^{bc}
	48-51	+	50.0 (24/48) ^c	12.5 (6/48) ^c
ICM	38-42	-	0 (0/39) ^a	0 (0/39) ^a
	43-46	-	6.9 (4/58) ^a	0 (0/58) ^a
	48-51	-	20.0 (10/50) ^b	2.0 (1/50) ^b
	48-51	+	25.9 (15/58) ^b	6.9 (4/58) ^b

1): 同一竖行数值中不同字母标记者表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母标记者表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 妊娠中期对供体细胞分步情况的检测结果

供体细胞	注射 hCG 后回收 2-细胞胚的时间 (h)	诺考达唑处理与否	重构胚胎数	妊娠中期的受孕数	
				检测数 (退化数)	嵌合数
TE	38-42	-	0	0 (0)	0
	43-46	-	1	1 (0)	0
	48-51	-	3	3 (2)	0
	48-51	+	6	6 (5)	0
	总计		10	10 (7)	0
ICM	38-42	-	0	0 (0)	0
	43-46	-	0	0 (0)	0
	48-51	-	1	1 (1)	0
	48-51	+	4	4 (3)	0
	总计		5	5 (4)	0

犬埃里希氏体病的诊治

张志宏, 李万荣, 杨石林

(江门市动物疫病预防控制中心, 广东 江门 529000)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0043-01

犬埃里希氏体病是一种主要发生于热带亚热带地区的由蜱传播的犬传染病。病原为立克次体科埃里希氏体属的犬埃里希氏体, 革兰氏染色阴性, 以单个或多个形式寄生于单核细胞和嗜中性粒细胞的胞质内膜空泡及血小板内。传播媒介主要是血红扇头蜱, 易感动物包括家犬、野犬、山犬、胡狼、狐和啮齿类, 无品种、性别、年龄差异。本病主要发生于夏、秋季节, 这与蜱及其他吸血昆虫的活动相一致。越冬的蜱常在翌年感染易感犬只, 成为病原的主要储存宿主。临床上以间歇性体温升高、鼻腔出血、各类血细胞减少为特征。

1 病例介绍

2009年6-9月, 我中心共接收犬埃里希氏体感染病犬4只。其中家犬2只, 年龄均为2岁左右; 金毛犬1只, 11月龄; 狼犬1只, 9月龄。病犬主要表现为间歇性体温升高、鼻腔出血、精神沉郁、厌食、体重减轻、结膜苍白等症状。根据临床症状怀疑为犬埃里希氏体病, 随即对犬只进行血液检查。

2 血液检查

取病犬末梢血液涂片, 姬姆萨染色后镜检, 可在单核细胞和嗜中性粒细胞中发现犬埃里希氏体被膜样包裹的包涵体, 从而诊断为本病。

3 治疗方法

四环素或强力霉素对埃里希氏体敏感有效, 单纯使用对急性或轻度慢性患犬治疗效果明显, 但对严重慢性患犬除了给予四环素或强力霉素以外, 还需配合其他药物对症治疗。我中心对以上病犬按照以下方法治疗:

3.1 口服土霉素, 按 22 mg/kg 体重, 每天 3 次, 连用 14 d。或者先用磺胺二甲嘧啶钠, 每天按 60 mg/kg 体重, 分两次肌肉注射, 连用 3~4 d; 然后给予土霉素口服, 服至体温恢复正常、鼻腔不再出血为止。

3.2 肌肉注射酚磺乙胺 0.5 g/次, 早晚各 1 次; 维生素 K1 10 mg/次, 每天 1 次; 连用 3 d。对于控制犬鼻腔出血有辅助性作用。

3.3 对体表有较多蜱寄生的犬, 皮下注射害获灭(伊维菌素), 按 0.1 mL/kg 体重, 6 d 后重复注射 1 次。

3.4 除应用以上药物外, 对于某些慢性的病例, 还配合一定的支持疗法。主要使用 5% 葡萄糖注射液, 加入维生素 C 2 mL、辅酶 A 2 mL、肌苷 2 mL 等, 每天 1 次静脉滴注, 连续用药 3 d。对于某些严重的病例, 一般需要治疗较长时间。

4 疗效与小结

4.1 经过上述治疗, 病犬从第 3 d 起, 精神明显好转, 食欲恢复, 鼻腔不再出血。1 w 后病情得到控制, 疗效显著。为巩固疗效, 应注意用药持续时间, 口服土霉素连续 14 d。临床上应根据病犬实际情况, 必要时也可连续服用 3~4 w。

4.2 犬埃里希氏体病主要是由蜱传播的传染病, 为预防本病的发生, 应尽量少带犬到草地玩耍, 或在蜱活动旺季, 在其食物中按 5~10 mg/kg 体重的剂量添加或直接投服土霉素或四环素, 平时注意消灭传播媒介, 对犬舍及周围环境和犬体定期药物灭蜱, 如使用蜱虱消喷雾、除癞灵沐浴、注射害获灭等均有较好的效果。

影响犬骨折愈合的因素

刘 鹏

(荣成市畜牧兽医站, 山东 荣成 264300)

中图分类号: S857.16*4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0044-02

凡骨折都有损伤的历史,如意外车祸、撞、压人为打击等。此外,还有病理性骨折,如骨质疏松、骨髓炎、骨瘤等也可诱发骨折。骨折分粉碎性骨折和断裂性骨折;有闭合性骨折和开放性骨折。另外,幼犬如果患有佝偻病、骨软症,外力作用即使不大,也常引起四肢长骨骨折。骨折的治疗以整复、固定为主,同时要配合对症处理和抗感染进行必要的全身用药等,后期要加强功能锻炼。笔者根据多年临床经验,总结了影响犬骨折愈合的因素,供大家参考。

1 血液循环

骨折部位的血液供应和骨膜状态直接关系到骨折愈合的进程。因此治疗骨折时应防止任何对局部血液供应的进一步破坏。使用低接触接骨板,有利于术后板下骨血液供应的重建。血液供应在骨发生过程中起两方面的重要作用:营养供应和提供能分化为成骨细胞的干细胞。骨折后被破坏血管的重建需要几周时间,而骨痂形成先于新血管长入,因此早期骨痂的营养取决于残存血管的延伸。参与骨折修复的细胞来源于骨膜等处,骨折治疗时骨膜的广泛剥离会延缓骨折愈合的进程。未移位的骨折,新血管的来源可能是髓腔,而在移位骨折,营养骨痂的新血管大部分来源于周围软组织内的脉管系统。因此,骨折时周围肌肉的失血管化是骨折延迟愈合的一个重要诱因。髓内钉安放时对骨折部的血供有一定影响,但通过骨膜和周围软组织血管的长入,骨折部位血液供应会重新建立。对于创伤较重的开放性骨折,髓内钉应用时应不扩髓以尽量减少对皮质血供的进一步干扰。

2 断骨间张力

骨折端的过分牵张可影响骨折愈合。当骨折

间隙大于 0.5 cm 时,骨折愈合时间要延迟到 12~18 个月,因为此时骨痂须跨越较大的间隙。临床上接骨板螺丝钉固定可阻碍骨端吸收后的接触,过分牵引、软组织嵌入都可造成骨折间隙过大。宽大的骨折间隙中将充满致密纤维组织,骨的发生受阻,最终影响愈合。但在适当的力学和生物学条件下,较大的间隙内也可形成骨性愈合,即所谓的牵张愈合,或称延长愈合。这些条件包括:骨膜相对完整、骨端血液供应良好、牵拉的力量必须连续稳定,其它方向的力必须控制。这时的骨折愈合方式为膜内骨化,参与骨折愈合的细胞来自骨外膜、骨内膜等处。临床上延长愈合常见于肢体延长、畸形纠正、缺损充填,以及治疗某些伴有短缩的骨不愈合治疗时。除少数情况,如骨折同时伴有较大缺损外,延长愈合的治疗方式不适用于新鲜骨折。

3 断骨固定方式

整复好的骨折部位松手后或当动物稍有活动时又会发生变位,必须采取措施进行可靠固定。固定方式可分为外固定和内固定两大类,其中,外固定在兽医临床中应用最多,一般需固定 40~60 天。外固定即使用各种绷带进行体外包扎固定。各种外固定一般仅适用于动物肢体的游离部位,对四肢中下部位的骨折才有固定意义。若为开放性骨折,整复固定时应首先作好彻底地清创和创伤治疗工作,尽可能地使开放性骨折迅速转化为闭合性骨折,努力防治创伤感染。适当的压力可促进骨的生长,而过分的压力则会引起小梁骨显微骨折、局部缺血、骨吸收、甚至骨坏死。有效的压缩可提供骨折端充分的稳定性,而取得这样的稳定至少需要 70~120 kg/cm³ 的压强。骨折端的稳定防止了断端间的活动,压缩还有利于减少骨折间隙,

这些都有利于骨折愈合。在绝对加压固定、骨折端供血良好的情况下,骨折可获一期愈合。但必须注意,在这样的压缩系统固定下,骨折端的坏死吸收可达7~12 mm,将使没有滑动装置的压缩固定基本失效,反而会阻碍骨折端的接触,延长骨折愈合时间。绝对加压固定的另一个问题是其应力遮挡效应,在骨折愈合的后期会使板下骨丧失必要的应力刺激,从而诱发局部骨质疏松和力学性能下降,而有接骨板疲劳折断和接骨板取出后再骨折的危险。因此,大约在术后1年需及时去除绝对固定装置,或采用刚度可逐渐衰减的接骨板-螺钉系统。

4 术后防止感染

感染所致的组织破坏和长期充血可造成骨折端和软组织坏死以及骨吸收,骨折愈合的正常程序被干扰和延长,严重时骨折愈合停止。也可引起骨髓炎并可能形成死骨和窦道。针对骨折时的不同情况和治疗过程中的不同阶段,选用适当的药物进行辅助治疗,有助于防治继发病和促进骨折愈合。如在骨折初期局部肿胀、瘀血明显时,宜选用一些活血祛瘀、消炎止痛的药物外敷或内服,可用的药物如跌打丸、云南白药、三七粉、红花油、伤骨散糊剂等。伤骨散在开放性骨折的治疗中,控制化脓感染十分重要。除应认真进行局部创伤处理

外,必须早期全身使用足量的抗生素或磺胺类药物等,至少连续用药2周以上。如常用青霉素160万~320万IU、链霉素200万~400万IU,混合肌注。一般还同时注射破伤风抗毒素1500~4500单位预防破伤风发生。为了加速骨痂形成,促进骨折愈合,增加钙质和维生素亦是必要的。可在食物中适量补加骨粉、碳酸钙和维生素A、D或鱼肝油,或多用肉骨汤喂犬。

5 功能锻炼

如粗暴的反复整复、过渡牵引、切开复位时作过于广泛的剥离、固定不可靠、术后锻炼不得法等。功能锻炼是治疗骨折的重要组成部分,它可改善局部血液循环,增强骨质代谢,加速骨折愈合及病肢的功能恢复,防止产生广泛的病理性骨痂、肌肉萎缩、关节僵硬、关节囊挛缩等后遗症。功能锻炼在不同的治疗阶段采取不同的形式,如在早期(1~2周内)主要采取局部按摩和对未固定的关节作被动地伸屈活动,尽量限制和减少病犬活动。2周以后便可逐渐进行运动锻炼,开始让其在小范围内活动,再过2周便可逐渐放开让其自由活动。骨折40~60天后若已拆除绷带,配合功能锻炼还可采用各种温热疗法和局部涂擦刺激剂的方法进行局部治疗,以促使病肢功能早日恢复。

2010“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2010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2011年第1期公布。

- 1、**评选范围:**本刊2010年度1-6期发表的文章。
- 2、**评选数量:**优秀论文数篇,分设一、二、三等奖。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。
- 3、**奖金来源:**总奖金20000元,由广东永顺生物制药有限公司赞助。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

二〇一〇年一月十六日

全自动尿囊液收获机的改进

麦康聪, 梁雄新, 黎坤德, 蒋德清, 董博华
(肇庆大华农生物药品有限公司, 广东 肇庆 526238)

摘要: 对全自动尿囊液收获机进行四项改造: 对全自动尿囊液收获机的管道进行改造、对链条电机调速器的改造、对收获位置上两条横截面为“┌”形的不锈钢的改造及对电磁阀的改造, 结果表明, 通过对全自动尿囊液收获机的改造, 提高了生产效率和胚蛋的利用率, 有效控制胚液受污染因素, 降低机器的故障率, 延长使用寿命, 降低生产成本。

关键词: 自动尿囊液收获机; 改进; 电机调速器; 验证

中图分类号: S817.85

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0046-03

自动尿囊液收获机是生产禽流感疫苗的专业设备, 使用自动尿囊液收获机来替代人的手工收获操作可以迅速提高禽流感疫苗的生产效率。自动尿囊液收获机使用在胚毒灭活疫苗生产中, 彻底改变了传统的生产工艺过程, 使工艺过程简单化, 占地面积缩小, 同等生产面积下生产能力提高4倍, 节省空调能源和大量的人力, 有利于提高产品质量及其均一性。本公司在实际的操作中发现该机性能有一定的缺陷, 针对这些问题, 我们对全自动尿囊液收获机进行四项改造。

1 材料与方 法

1.1 鸡胚 接种 H5N1 (Re-1 株) 后的鸡胚 (1000 枚)

1.2 试验试剂 营养琼脂: 购自北京中龙正虹药业有限公司。

1.3 试验器材 不锈钢、电焊、双相可控硅、采样器、过滤薄膜 (0.22 μm 孔径)、培养箱、硅胶管。

1.4 管道改造 从收获→离心→灭活, 除了要经过蠕动泵使用硅胶管其他连接点都用不锈钢, 管道全长大约 20 m。

1.5 链条电机调速器的改造 ①在电动机控制回路中串入双相可控硅; ②在调速器的反馈回路中串入一个调节电路。

1.6 收获位置上不锈钢的改造 有两条横截面为“┌”形的不锈钢的改造: 改为用“└”形的不锈钢代替。

1.7 电磁阀的改造 将电磁阀移入控制箱内的左下角固定。

1.8 实验室验证 ①检查同一季度改造前和改造后收获的灭前半成品胚液的杂菌数 (各 10 批); ②观察一批次收获过程中链条因走位导致收获吸头不能准确插入胚蛋的次数; ③每批清场后, 对“┌”截面进行清洁效果验证: 利用灭菌棉拭子进行清洁干燥的 30 cm² 的表面拭擦后, 分别加进 100 mL 灭菌 PBS 缓冲液中, 摇匀后, 利用薄膜过滤法^[1] (0.22 μm 孔径) 进行微生物限度检测^[2]。

1.9 数据分析方法 利用 SPSS 统计分析软件 Independent-Samples T Test 进行显著性检验。

2 结果

2.1 同一季度改造前和改造后收获的灭前半成品胚液的杂菌数的比较, 见表 1。利用 SPSS 统计分析软件 Independent-Samples T Test 进行显著性检验, 改造前和改造后收获的灭前半成品胚液的杂菌数比较差异显著 ($P < 0.05$), 说明改造后半成品胚液杂菌数明显下降。

2.2 一批次收获过程中链条因走位导致收获吸

表 1 改造前后灭前半成品胚液的杂菌数结果

状 态	各批胚液的杂菌数 (cfu/mL)									
改造前	100	120	250	320	250	200	130	135	350	310
改造后	100	110	80	80	65	60	80	80	100	110

表 2 改造前后收获吸头不能准确插入胚蛋的次数统计结果

状 态	误插次数(次/批)									
改造前	10	15	12	8	5	6	5	10	20	30
改造后	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2

表 3 改造前后清洁效果验证结果

状 态	微生物限度检测 (cfu/30cm ²) ¹⁾									
改造前	10	20	50	20	40	100	5	10	30	100
改造后	1	0	0	1	2	0	0	2	3	1

1): GMP 标准为 $\leq 1\text{cfu}/25\text{cm}^2$

头不能准确插入胚蛋的次数, 改造前和改造后分别观察 10 批, 见表 2。利用 SPSS 统计分析软件 Independent-Samples T Test 进行显著性检验, 改造前和改造后误插次数比较差异显著 ($P < 0.05$), 说明改造后明显降低误插次数。

2.3 每批清场后, 对“┌┐”截面进行清洁效果验证 (各 10 批), 见表 3。利用 SPSS 统计分析软件 Independent-Samples T Test 进行显著性检验, 改造前和改造后清洁效果验证比较差异显著 ($P < 0.05$), 说明改造后清洁验证微生物含量显著降低。

3 讨论

3.1 管道改造 未改造前: 经全自动尿囊液收获机的吸头收获后的胚液暂存于不锈钢储液罐中, 然后通过蠕动泵和硅胶管道输送至称量工序, 用 2 万 mL 容量的不锈钢瓶并按每瓶 20 kg 的量进行分装, 每批约用 35~40 个不锈钢瓶, 然后旋紧盖子转移至冷库暂存, 按瓶数统计总产量, 然后从冷库中取出不锈钢瓶, 逐瓶打开盖子进行离心, 此过程胚液暴露时间长, 存在潜在受污染的风险。

改造后: 经全自动尿囊液收获机的吸头收获的胚液, 自动输送到不锈钢储液罐中, 然后通过蠕动泵的作用, 经硅胶管连接不锈钢管道, 直接输送至离心机, 进行离心工序, 离心后的胚液再一次通过另一台蠕动泵, 经硅胶管连接不锈钢管道, 直接输送至安放在电子天秤上的 20 万 mL 容量的周转罐中, 通过压缩空气的作用下, 经不锈钢管道直接输送至灭活罐进行灭活工序。使得胚液从收获至灭活整个过程完全在封闭的条件下进行, 完全避免胚液暴露, 大大降低胚液受污染的风险。

3.2 对链条电机调速器的改造 未改造前: 由于厂家配套的链条电机调速器在运行过程中不稳

定, 容易造成链条走位, 以致收获吸头不能准确插入胚蛋中, 经常需要人手调整和反复清洗链条才能收获, 影响了生产效率和工作速度, 而且使胚液容易受到污染, 影响收获质量。

改造后: 该机配套的交流齿轮减速电机调速器, 具有体积小, 调速范围宽, 耗能低, 寿命长, 使用方便, 能与国内生产的单相异步电动机配套使用, 实现反馈行速和无级调速。广泛用于生产流水线作调速装置, 但其存在控制精度低, 在启动频率过高或负载过大易出现掉步或堵转的现象, 停止时转速过高易出现过冲现象, 所以经常出现链条错位。

原本计划将此控制器和配套的端链安装齿轮减速电机, 换为进口的交流伺服系统 (以包括电动机)。但考虑到维护成本高配件昂贵难找到 (要提前预定)。经详细分析其工作原理: 在电动机控制回路中串入双相可控硅, 控制可控硅的导通角, 从而控制电动机的端电压。当负载波动引起转速变动时, 与电动机同轴联接的测速软件输出信号通过积分器与转速基准信号比较, 其误差放大后和触发器实现电压自动调整。另一方面, 通过光电扫描器检测链条的实际位置, 并与设定位置进行比较, 输出脉冲信号给 PLC, 然后 PLC 再控制该调速器进行位置调整, 构成了同步控制回路。经过反复研究实验, 在其反馈回路中串入一个调节电路, 就可以使收获机运行稳定, 链条不走位, 收获吸头能准确完成收获动作, 保证了收获的质量。

3.3 对收获位置上两条横截面为“┌┐”形的不锈钢的改造 未改造前: 在收获机的收获位置上, 有两条横截面为“┌┐”形的不锈钢与传动链条平行, 其作用是支撑和定位蛋托, 使收获头能顺利穿

透蛋壳,进行收获。由于设计与实际应用上有一定的差距,经常有胚液流入里面。

改造后:改为用“T”形的不锈钢代替,使收获机容易清洗、消毒,杜绝了细菌的滋生,避免胚液受到污染,使胚蛋的利用率得到提高。

3.4 电磁阀的改造 未改造前:收获机是利用汽缸带动收获头进行收胚,而控制汽缸动作的是一只五方口的电磁阀。电磁阀是安装在控制箱的外面,刚好处在传动链条的下方。在工作时,沾在链条上的酒精和胚液经常滴在它的上面,这会使其容易损坏,增加机器的维修故障率;而且沾在它上面的酒精胚液混合物不易清洗干净,存在卫生隐患。

改造后:将电磁阀移入控制箱内的左下角固定,不容易受到酒精和胚液的腐蚀,降低其故障的发生,延长了使用寿命,提高收获机的可靠性和经济性。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局药品认证管理中心. 药品生产验证指南[M]. 化学工业出版社, 2003. 192.
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京:中国农业出版社, 2005.
- [3] 徐长军, 王峰, 苏艳岩, 等. 双向可控硅的设计及应用[J]. 电子产品世界, 2008, 15(12): 33-35.

(上接第 42 页)

32.7%; ICM 组: 20.0%), 主要是因为注射 hCG 48~51 h 后收集到的 2- 细胞胚大部分处于 G2~M 期, 在下次分裂期将供体核移入受体卵裂球中可能会引起染色体提前聚集(PCC)和下次有丝分裂。虽然没有检测到重构胚中的染色体组分, 发育到囊胚阶段的重构胚数量也较少, 这可能是由于在 S 期的供体核也发生了染色体提前聚集(PCC)和有丝分裂。用诺考达唑处理的重构胚发育到 4- 细胞期的比率, 较对照组有极显著(TE: 50% vs 32.7%)和显著(ICM: 25.9% vs 20.0%)的差异。该发育机制目前还不是很清楚, 但是由于诺考达唑处理使受体胞质与供体核之间的细胞期产生同步化, 在停止使用后 4h, 有许多重构胚发育到 4- 细胞期(TE: 83%; ICM: 73%)。但是, 在其发育到 8- 细胞期或者致密桑葚胚阶段, 有少许卵裂球并没有出现致密化。在本试验中, 所有的囊胚都有少许的卵裂球。把这些囊胚移植到受体雌鼠体内, 在孕体中并没有检测到供体核的分布, 这说明重构胚的发育在少量细胞分裂后, 都发生了延迟或者停止, 不利于胚泡附植后的后续发育。

Kato 等(2007)报道, 通过去核卵中的供体核重编程, 可以表明雄鼠胎儿生殖细胞的全能性, 把雄鼠胎儿生殖细胞转移到去核卵中, 来把遗传发育信息重编到受精卵中, 并将这些重构卵培养到 2- 细胞

期, 从而来产生嵌合胚。以后, 我们也将着重检测 TE 细胞核的发育全能性是否是由该过程所引起的。

参考文献:

- [1] Gardner R L. Origin and differentiation of extra-embryonic tissues in the mouse[J]. Int Rev Exp Pathol, 2003, 24: 63-133.
- [2] Koto Y, Tsunoda Y. Pluripotency of mouse embryonic cells on germ line at 3.5-8.5 and 11.5 days post-coitum after aggregation with precompacted embryos[J]. Develop Growth Differ, 2005, 37: 79-84.
- [3] Sotomaru Y, Koto Y, Tsunoda Y. A comparative investigation on the potency of cells from the inner cell mass and trophectoderm of mouse blastocysts to produce chimeras[J]. Theriogenology, 2006, 48: 977-984.
- [4] Nakamura K, Tsunoda Y. Chimeras obtained by the nuclear transplantation technique in the mouse[J]. Animal Reproduction, 2007, 33: 82-87.
- [5] Eyestone W H, First N L. Co-culture of early cattle embryo stage with oviducal tissue or in conditioned medium[J]. Reprod Fertil, 2007, 85: 715-720.
- [6] Eicher E M, Washburn L L. Assignment of genes to regions of mouse chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 75: 946-950.
- [7] Koto T, Tsunoda Y, Watanabe T, et al. Development of chimeric two-cell mouse embryos produced by allogenic exchange of single nucleus from two- and eight-cell embryos[J]. Gamete Res, 2005, 24: 375-384.

一例山羊败血性链球菌病的诊断与综合防治

陈绍俊

(广东省普宁市畜牧水产局, 广东 普宁 515300)

中图分类号: S858.27

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0049-02

2009年3月2日,广东省普宁市某黑山羊养殖户到我局反映疫情:最近一个多月以来,该场山羊出现轻度发热、食欲不振、有的出现咳嗽、精神不振、步态不稳,不久便不治而亡,很多新生羔羊也受到感染而成活率很低。先后曾用过苦木注射液、恩诺沙星、菌必治、地塞米松注射液、柴胡等多种药物注射,但治疗均无明显效果。接诊后,我们根据病羊的临床特征症状和病理剖检变化结果,诊断该场羊群感染了羊败血性链球菌,经采取综合治疗与防控措施后,羊群逐渐康复。

1 临床症状

临诊时该场病羊体温普遍升高,个别体温升高到41℃,精神萎靡,食欲减退或废绝;消瘦、步态不稳、咳嗽;有的垂头呆立不愿走动;有的病羊眼结膜充血、流泪,随后出现液性分泌物,鼻腔流出浆液性脓性或黏性透明鼻涕;粪便中带有黏液。

2 病理剖检变化

剖检2只病羊均可见大部分脏器泛发性出血,全身大部分淋巴结肿大,充血出血。咽喉和气管黏膜充血出血。肺脏出现轻微水肿、出血;肝脏肿大,呈土黄色,边缘钝厚,出现病变区。胸、腹腔液及心包液增量。

3 实验室检查

涂片镜检取病死山羊血液、心包液、肝、脾、淋巴结涂片或触片、染色、镜检,可见革兰氏阳性成双或短链状排列的球菌,菌体外有荚膜。

根据临床症状,病理剖检变化,诊断为羊败血性链球菌病。

4 治疗与防治措施

根据对羊群病情的分析,结合其临床表现,我们采取对因治疗和对症治疗相结合,排除致病原因,稳定病情,加强对病羊的护理,具体方案包括:

4.1 隔离病畜。对已发病感染的羊只实行隔离分群饲养,直至治疗康复。

4.2 加强场地消毒。用强力消毒灵和菌毒杀交替使用,分别按1:300和1:2 000的比例稀释,对全场进行喷雾消毒,每天两次,彻底消灭病源,切断病菌的传播途径。

4.3 对已经发病感染的羊只,采用抗病毒I号100 mL(主要成分为黄芪多糖、黄芪皂甙等,成都坤宏动物药业有限公司生产)、头孢双响炮(四川省精华动物药业有限公司生产)10支、鱼腥草注射液(广东新理想生物制药有限公司生产)100 mL混合肌注,40 kg左右的肌注15~16 mL/只,20 kg左右的肌注8~10 mL/只。同时肌注中龙林可(主要成分是盐酸林可霉素,北京中龙正虹药业有限公司生产)5 mL/只、中龙芪抗[主要成分是黄芪多糖(特制)等]5 mL/只,分开注射,每日注射1次,连用3 d。

4.4 对未发现感染或疑似感染的羊只,采用抗病毒I号100 mL、头孢双响炮10支、鱼腥草注射液100 mL混合肌注,40 kg左右的肌注15~16 mL/只,20 kg左右的肌注8~10 mL/只。

4.5 在注射药物的同时用福莱先锋(主要成分是荆芥、防风、金丝桃素等提取物,郑州福源动物药业有限公司生产)、阿莫西林粉(广州白云山宝神动物保健品有限公司生产)、0.1%黄芪多糖口服液(广州白云山宝神动物保健品有限公司生产)三种药物拌料(均按1:3比例)饲喂5 d,对病情严重食欲不佳的羊只用这三种药物按剂量用水灌服,连用5 d。

4.6 做好羊只的免疫工作。对这段时间的新生羔羊或新购进羊只马上用羊败血性链球菌病活疫苗紧急免疫,尾根部皮下注射0.5 mL/只,免疫期1年。

5 讨论

5.1 防疫意识淡薄,无制订任何免疫程序。该场是

新建场地,对羊的防疫认识不足,认为肉羊养殖不用进行防疫。场主和饲养管理人员缺乏防疫知识,从外地购买羊只前后都未对羊群做任何免疫。这使羊群乃至新生羔羊对羊败血性链球菌的自身免疫力较低。

5.2 对购进的羊只未实施检疫与隔离措施。据该场场主介绍,近期又购进一批新羊来补充,与本场羊群进行混养,之前未经过任何检疫和隔离措施。由于羊只在长途运输、饲养环境与饲料营养的改变,加上对当地气候还不能完全适应的情况下,机体抵抗力和免疫力都会下降,容易引起发病。

5.3 营养的影响。由于冬季日粮饲料中青饲料比较少,营养成份简单,主要以地瓜切粒、薯藤、树叶等为主粮,缺乏重要蛋白质、能量、矿物质和多种维生素,从而造成日粮的简单和不平衡,羊群掉膘严重,机体体质下降,容易感染疾病。

5.4 养殖场地设置不合理,消毒不规范。该场是一个新建羊场,建于干燥的小山丘上,以敞蓬式搭棚,不容易保温保暖;而且以砂石、稻草为垫料,容易刮

伤羊体,感染引起群发病。同时没有建立完善消毒制度,没有进行过全面消毒和换垫料,消毒效果不明显,病原体没有全面根除,造成连续感染发病。

5.5 该病的主要危害是由于发病羊出现全身性出血性败血症,各脏器均有病变,从而影响哺乳或采食,导致病羊食欲不振,陷入饥饿状态,造成掉膘和抵抗力下降,容易发生继发感染,尤其易继发呼吸道疾病(如浆液性肺炎与纤维素性胸膜肺炎),从而引起感染羊只病死率增高。

5.6 疫苗免疫是预防本病的可靠途径。可采用活疫苗在疫区内免疫接种用于该病的预防和控制。注射羊败血性链球菌病活疫苗,0.5~1.0 mL/只,尾根部皮下注射,免疫期1年。

5.7 该场的病羊和带菌羊只是本病的主要传染源,经呼吸道和损伤的皮肤可传播。彻底消毒灭源,是控制羊败血性链球菌病流行蔓延的重要措施。消毒方法为:羊舍选用强力消毒灵、聚维酮碘或菌毒杀喷雾消毒;圈舍周围、入口可用强克或2%烧碱喷洒消毒;手、工作服、胶靴用消特灵浸泡消毒。



大北农集团
DA BEI NONG GROUP

20万招聘精英

福州大北农生物技术有限公司是北京大北农集团下属的子公司,集产品研发、生产、销售和服于一体的高新技术企业,并以“为动物生产提供一流生物制品和疫病预防解决方案”和“生产免疫保护力更强的动物疫苗”为宗旨。公司重点产品“猪稳康(猪瘟脾淋弱毒疫苗)”、“伪狂静(猪伪狂犬弱毒疫苗)”、“囊盾(鸡传染性法氏囊炎弱毒疫苗)”和“领风(鸡毒支原体弱毒疫苗)”已在用户心中树立了良好的品牌形象。

公司以“人是北农发展的唯一资源”,提供充分展示自己才华的争创第一的事业舞台、充分信任充分授权的创业氛围、系统完善的培训、股权激励、健康的生活方式与成功的工作方法、具有相对竞争力的薪资待遇。福州大北农特向全国各地招聘380名专业技术人员,其中管理人员20名,产品研发人员30名,生产技术人员50名,技术服务经理50名,大客户经理50名,技术营销专员180名。

畜产品部:游仁华 13809511690

禽产品部:赵张利 13393051093

人力资源部:林琼 0591-83646376(O)、0591-83628994(F)

公司网址:www.fzdbn.com

E-mail: fzdbnhr@yahoo.com.cn

公司地址:福建省福州市晋安区东门外园中村110号

邮编:350014

广西藤县推行畜禽免疫补针日试点工作初探

覃远天

(藤县濛江镇水产畜牧兽医站, 广西 藤县 543312)

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2010)01-0051-02

为提高散养畜禽的免疫密度和免疫质量,广西藤县从2008年9月1日开始在天平、塘步、濛江三个镇开展畜禽免疫补针日试点工作,取得了较大的成效。现报告如下:

1 试点工作开展基本情况

这次试点工作在天平、塘步、濛江三个镇57个行政村298自然村开展,共出动县水产畜牧兽医干部32人、乡镇政府干部79人、乡镇水产畜牧兽医站干部25人、村干部和村级动物疫病防治员371人。印刷宣传横幅38条,发放宣传资料10万份。召开县级会议2次、镇级会议6次、村级会议57次。发放免疫证保管袋3万个,共投入试点工作经费5.5万元。经过去冬今春的试点工作,三个乡镇的动态免疫密度达到较高水平,没有发生重大动物疫情,取得了较好的免疫效果。

2 主要做法和保障措施

2.1 主要做法

2.1.1 “畜禽免疫补针日”制度的做法是:在每年春秋两季分别对畜禽进行一次集中免疫(即春防和秋防)的基础上,每个自然村每月固定一日定为畜禽免疫补针日,对新增栏、免疫集中月不适宜免疫、超过免疫保护期的应免动物进行及时补免。由相邻2~3个村的村级防治员组成防疫小组,上门到各养殖户进行畜禽免疫注射。乡镇水产畜牧兽医站根据各村畜禽饲养数等情况设点,确定“畜禽免疫补针日”,并在该村公布,做到畜禽免疫服务经常化、规范化、制度化,形成长效机制。

2.1.2 实行免疫签名制度。对已免疫的畜禽佩戴畜禽标识,填发免疫证,建立畜禽免疫档案,由养殖户主签名确认,确保免疫数字的真实。

2.1.3 每个养殖户发放一个免疫证保管袋,钉在畜禽栏舍适当的位置,方便上级部门检查验收。

2.1.4 实行免疫绩效补助制度。除县政府和上级的补助按月正常发放外,村防治员的报酬实行免疫绩效补助。体现多劳多得的原则。免疫补针日按免疫高致病性禽流感、牲畜口蹄疫、高致病性猪蓝耳病和猪瘟的数量,猪、牛补助1元/头,家禽补助0.03元/羽。免疫数量由村防治员统计上报乡镇兽医站,经乡镇兽医站检查核实,并由站长签字加盖单位公章上报到县局,县局把补助款汇入村防治员存折。

2.2 保障措施

2.2.1 县政府重视,出台相关文件。对试点工作提出目标任务、时间要求、具体措施等,使试点工作开展有据可依。

2.2.2 加强组织领导。成立试点工作领导小组,领导小组组长由水产畜牧兽医局局长担任,副局长任副组长,局二层单位负责人和试点乡镇的站长任组员。同时成立三个试点工作小组,分别到三个乡镇指导开展工作。

2.2.3 落实经费。县政府重视,落实试点工作经费5.5万元,用于印刷宣传资料和试点工作的具体实施经费。

2.2.4 层层做好宣传发动工作。一是组织召开乡镇人民政府分管动物防疫工作的领导、水产畜牧兽医局及局二层机构业务部门和乡镇兽医站正副站长参加的动员会。二是乡镇人民政府召开镇、村干部和乡镇兽医站干部、村动物疫病防治员参加的会议,统一思想,提高认识。三是以村为单位召开村小组长会议,发放宣传资料,宣传免疫补针日的意义和做法。四是张贴畜禽免疫补针日告示牌和畜禽免疫明白栏,明确告知各村养殖户该村的固定免疫日期,将国家规定必须预防的重大动物疫病种类、防疫收费标准、防疫周期、防疫对象、防

疫人员和防疫热线、监督电话等予以公布,提高动物防疫政策的透明度,增强群众自觉免疫意识、监督意识,促进工作的开展。

2.2.5 实行乡镇兽医站干部包村责任制。把辖区内各村按相邻负担免疫的畜禽数基本一致的原则分成若干个防疫小组,由乡镇兽医站干部任组长,负责指导开展工作,调动村动物疫病防治员工作积极性,确保免疫工作平衡开展。

2.2.6 加强督查指导,确保工作取得实效。一是县水产畜牧兽医局制定“免疫补针日”考核内容和督查办法,定期或不定期地对各村免疫日工作进行督促检查,作为村动物疫病防治员工作考核内容之一;二是设立并公布监督电话,受理群众的检举、投诉。

3 开展畜禽免疫补针日试点工作取得显著成效

3.1 据县动物疫病预防控制中心统计,塘步、天平、濛江三个试点镇的2009年春防和2008年秋防高致病性禽流感、牲畜口蹄疫、猪瘟和高致病性猪蓝耳病四种强制免疫疫病的免疫密度和免疫质量大大提高,创历史最好水平。

3.2 提高疫苗的利用率。有时免疫补针日应免畜禽不多,多人联合工作在一定程度上加快工作节奏,从而为争取更多时间免疫更多畜禽,减少疫苗浪费。

3.3 畜禽免疫档案管理得到规范。表现在每户发放免疫证保管袋,使畜禽免疫证得到有效保管,家畜免疫后按一畜一证发放免疫证,家禽按一户一证发放免疫证。村防治员以养殖户为单位建立畜

禽免疫档案,乡镇站以行政村、规模养殖场为单位建立免疫档案,县动物疫病预防控制中心以乡镇、规模养殖场企业(场)为单位建立畜禽免疫档案。方便县镇兽医部门监督和技术指导,促使村防治员免疫做到真苗真打,达到提高免疫质量。

3.4 通过在“免疫补针日”建立畜禽免疫补针日告示牌和畜禽免疫明白栏,提高动物防疫政策的透明度,进一步规范村级疫病防治员的行为,如免疫收费,上门免疫服务等。

3.5 实行防疫小组上门开展免疫补针和防疫登记表上户主(或见证人)签名,提高免疫数据的可信度。按劳取酬既调动工作积极性,又增加村防治员经济收入。

4 开展免疫补针日活动的体会

4.1 政府重视,镇村干部参与,宣传到位,是顺利开展“免疫补针日活动”成功的关键。得到镇村干部的支持,做好群众的宣传工作,才能使免疫补针日工作顺利开展。

4.2 落实镇兽医站干部包村负责制,督查指导到位是免疫补针日顺利开展的保障。只有镇兽医站包村干部定时或不定时到村到点督查指导,发现问题及时提出整改意见,帮助解决一些疑难问题,促使村防治员开展正常的免疫补针工作。

4.3 落实和稳定村级防治员的劳动报酬,加强业务技术培训,加强考核和督查,使免疫工作成为村级防治员的自觉行动,使免疫补针日形成长效机制。

· 链接 ·

如何使疫苗免疫达到最佳效果

动物免疫是目前控制动物疫病的最有效手段,那么在使用疫苗时应注意和采取何种措施,才能达到最佳的免疫效果,真正起到预防的目的呢?

1. 严格执行饲养管理和卫生清洗消毒措施对疫苗免疫能否达到最佳效果至关重要,因为只有动物处于空气清新、无污染的环境下,接种疫苗才能产生最佳的免疫应答反应。

2. 不要教条地照抄照搬书本上的免疫程序,要根据本场、本地区动物疾病发生特点合理地制订免疫种类和程序。

3. 一定要选用质量可靠的疫苗,要严格按照说明书或专家建议进行操作,以免引起不良反应,凡无厂家、无批准文号或保存不当、过期的疫苗坚决不用。

4. 在免疫过程中要保证养殖场内适宜温湿度、减少噪音,免疫后饮水中加入电解多种维生素2~3天,减少疫苗对鸡只的应激,免疫前后3天内不得消毒,以免对免疫反应产生干扰。

5. 用饮水免疫法时,要确保水中不含氯制剂、重金属等能杀灭疫苗的物质,饮水时间一般在1.5~2小时内完成,水中可以加1%~2%鲜奶或0.1%~0.2%的脱脂奶粉,有条件的要在免疫后间隔一定时间做免疫效果监测。

6. 健康动物在使用疫苗后可产生较强的免疫力,病弱动物则影响免疫力的产生,因此对发病动物建议先不进行疫苗免疫。