

# 广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊

1976年3月创刊

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省畜牧兽医学会

广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院兽医研究所

主 编: 蒋宗勇

副 主 编: 孙彦伟

责任编辑: 孙彦伟 岑俏梅

编委主任: 蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军

曹俊明 辛朝安 廖 明 曾振灵

毕英佐 王贵平 舒鼎铭 孙彦伟

蔡建平 王政富 刘彩霞 岑俏梅

特邀编委:

陈 峰 余丽明 徐建浩 黄小建

陈小云 郑庆禄 贺湘仁 李 岩

林旭堃

出版单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

E-mail:gdmsyjkj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

出版日期:8月18日

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

# 目 录

## ·专题综述·

- 基因打靶技术的研究概况.....彭礼繁(3)
- 维生素D生物功能的新进展.....杨宽民, 蒋宗勇(8)
- 细胞高密度培养关键技术研究进展.....蔡植松, 齐冬梅, 等(11)

## ·畜牧技术·

- 矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡产蛋性能比较研究.....张国杭(14)
- 规模化猪场保育猪的生产管理技术.....刘世强(16)
- 珍禽——孔雀的饲养前景广阔.....毕小艳, 张 彬(18)

## ·兽医临床·

- 广东省部分猪场副猪嗜血杆菌的分离与鉴定.....姚晓辉, 陈芳艳, 等(20)
- 新疆石河子地区隐形乳房炎病原菌的分离鉴定和药敏试验.....刘东军(22)
- 一例鸡球虫病的诊断报告.....魏昆鹏, 郭万华, 等(24)
- 金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定和药敏实验.....宋德平, 朱芝秀, 等(26)
- 生猪“瘦肉精”残留的危害及防治对策.....邹淑当, 卢沛炯, 等(29)

## ·试验研究·

- 伪狂犬病毒荧光定量PCR检测方法的建立.....田 云, 任裕其, 等(31)
- 不同时期H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>病毒的HA和NA基因进化树及基因变异率线性回归分析  
.....潘德敏, 江经纬, 等(34)
- 猪瘟病毒RT-LAMP实验诊断初报.....曾小娜, 刘中勇, 等(38)

## ·宠物园地·

- 氯芬黄敏片引起犬的胃损伤的临床及组织学观察.....庄瑞宏, 吴仲恒, 等(41)
- 一例犬胸壁透创的救治报告.....毛天翔, 张忠传, 等(43)
- 犬的疫苗与接种问题.....郭淑萍(44)

## ·经验交流·

- 山羊养殖须把好“五关”.....周志可, 谭武强(45)
- 一起猪链球菌病和伪狂犬病的混合感染的诊治.....麦康荣, 林伟明(47)
- 浅谈中西医结合治疗牛青树叶中毒病的体会.....李天海(49)
- 奶牛子宫蓄脓的治疗体会.....刘瑞鑫, 罗鲜青, 等(51)
- 一起兔瘟的诊断报告.....温 娟, 黄 苑, 等(52)

## ·信息之窗·

- 2009“永顺杯”优秀论文评选启事.....(7)
- 中国最大的禽流感疫苗生产基地落户广东肇庆.....(52)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

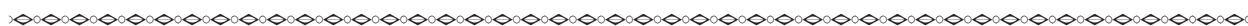
Established in march 1976(Bimonthly)

Aug.2009 Volume 34,Number 4 (Total No.146)

---

## Main Content

- Research progress in the gene targeting technology ..... Peng Lifan (3)
- New advance on the biological function of vitamin D .....Yang Kuanmin, Jiang Zongyong (8)
- Research progress on the high-density culture of cells ..... Cai Zhisong, Qi Dongmei, et al (11)
- Comparison on laying performance of yellow dwarf chicken, Xinxing yellow chicken and Guangxi yellow chicken  
..... Zhang Guohang (14)
- Feeding practice of weaned pigs in large-scale pig farms ..... Liu Shiqiang (16)
- Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* strains from pig farms in Guangdong province .....  
..... Yao Xiaohui, Chen Fangyan, et al (20)
- Isolation and identification of pathogens for subclinical breast inflammation in Shihezi district of Xinjiang uygur autonomous  
region and the drug sensitivity test of the pathogens.....Liu Dongjun (22)
- One case report on the diagnosis of chicken coccidiosis ..... Wei Kunpeng, Guo Wanhua, et al (24)
- Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas hydrophila* from goldenfish ..... Song Deping, Zhu Xiuzhi, et al(26)
- Establishment of a quantitative real-time PCR method for detection of pseudorabies virus..... Tian Yun, Ren Yuqi, et al(31)
- Phylogenetic and linear regression analysis on HA and NA gene of  $H_5N_1$  virus during different periods.....  
..... Pan Demin, Jiang Jingwei, et al(34)
- Laboratory detection of CSFV using the method of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification.....  
.....Zeng xiao-na, Liu Zhongyong,et al(38)
- Clinical and histological observation of traumatisme gastrique caused by Ganmaotong in dogs .....  
.....Zhuang Ruihong,Wu Zhongheng, et al (41)
- Vaccines for dogs and the vaccination problems ..... Guo Shuping (44)
- Five key measures in goat feeding practice ..... Zhou Zhike, Tan Wuqiang (45)
- Diagnosis and treatment of co-infection of *Streptococcus* and *Pseudorabies* ..... Mai Kangrong, Lin Weiming(47)
- Treatment of toxonosis of cattles caused by *Qingganye* with the combination of TCM with Western medicine .....  
..... Li Tianhai(49)



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

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

Chief Editor:JIANG Zong-yong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

# 基因打靶技术的研究概况

彭礼繁

(沈阳农业大学动物胚胎工程实验室, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 基因打靶是通过外源 DNA 与染色体 DNA 同源序列之间的重组来改造基因组特定位点, 从而改变生物遗传特性的方法。它可以纠正染色体特定位点上的自发突变, 恢复细胞正常的生理功能; 也可以把理想突变引入到基因组的某一位点, 使之稳定地遗传下去。本文从基因打靶的基本原理、打靶载体、打靶策略、筛选策略、条件性打靶及其实际应用等方面做了详细的综述。

**关键词:** 基因打靶

**中图分类号:** S814.8

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0003-05

基因打靶 (gene targeting) 也称为基因定点同源重组或基因敲除。它是通过同源重组将外源基因定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点, 以达到定点修饰改造染色体上某一基因为目的的一项技术。它克服了随机整合的盲目性和危险性, 是一种理想的修饰、改造生物遗传物质的方法。进行条件性可诱导性基因打靶系统的建立, 使得对基因靶位点在时间和空间上的调控更加精确, 它为发育生物学、分子遗传学、免疫学及医学等学科提供一个全新的研究手段, 也涉及到基因功能的研究、生产具有商业价值的转基因动物和植物、异体动物器官移植和人类疾病的基因治疗等多方面。

## 1 基本原理与分类

基本原理是指通过同源重组将外源基因定点整合入靶细胞基因组上的某一位点。根据其发生的机制, 可分为四种类型: 同源重组、位点特异性重组、转座重组和异常重组。它们共有的特征是 DNA 双螺旋之间的遗传物质发生交换。其中, 同源重组又分成三种类型, 即染色体间重组、染色体内重组、基因打靶。基本条件是: 在交换区具有相同或相似的序列; 双链 DNA 分子之间互补碱基进行配对; 有重组酶的参与; 异源双链区 Holliday 中间体的形成。Capecchi 等<sup>[1]</sup>对 *E. coli* 的重组进行了基因分析, 并发现了与同源重组有关的酶 RecA 和 RecBCD。RecA 能与单链和双链 DNA 结合, 而 RecBCD 等在离体状态下仅对双链 DNA 表现有亲和性。近年来有研究人员<sup>[2~4]</sup>发现在哺乳类动物细胞中也存在着类似的蛋白质, 它们可能存在相似的同源重组机理。

## 2 基因打靶载体

打靶载体通常包含两段与打靶区域两端同源的区域, 中间一段不同源且为目的序列, 并带有某种药物筛选标记。应用于基因打靶的载体构建策略通常有插入型载体和置换型载体。插入型载体, 是指断裂位点位于同源序列内, 选择基因紧邻同源目的序列, 载体 DNA 同源目的序列与染色体靶位点发生一次同源交换。整个载体整合到染色体靶位点上。置换型载体, 是指断裂位点位于同源序列的外侧或两侧, 选择基因位于同源目的序列内部或外侧, 载体 DNA 同源目的序列与染色体靶位点发生两次同源交换。两者的区别在于载体与靶基因组同源序列双链断裂位点的位置不同。Orban 等<sup>[5]</sup>研究发现, 基因敲除突变都采用置换型载体进行基因打靶。Lakso 等<sup>[6]</sup>也认为, 在小鼠 ES 细胞载体中采用与打靶目的细胞系相同的同源序列可获得提高 5~20 倍的同源重组效率。

## 3 基因打靶策略

**3.1 完全基因剔除策略** 研究某一非持家基因的功能时, 通常采用此策略。即利用同源重组的原理设计置换型载体, 将靶基因关键的外显子破坏或将靶基因完全缺失。采用此种策略时要考虑到基因间的代偿效应和可能的渗漏突变对表型产生的影响。

**3.2 大规模随机基因捕获策略** 当要研究许多基因的功能时可采用此策略。设计启动子缺失的插入型载体, 可随机插入到基因组中, 当插入到表达基因的外显子中时, 利用筛选标记基因即可得到众多的突变体细胞, 进而获得突变动物。Thomson 等<sup>[7]</sup>认为其缺点是只能获得表达基因的突变

体,而且不能实现对基因的精细修饰。

**3.3 精细突变打靶策略** 在基因组中引入精细的突变可以避免在重组位点留下外源的选择性标记,从而使人们对基因的功能进行更为精确的研究。另外基因打靶的目的之一就是要建立疾病的动物模型,有些疾病的发生是由于基因的点突变引起的,因此就需要建立精细点突变的动物模型。引入精细突变的策略主要有以下几种:

**3.3.1 “打了就走”** Orr-weaver 等<sup>[8]</sup>提出了“打了就走”法(Hit and Run),是指构建一种插入型载体,在载体的同源序列含所需的突变序列,同源序列之外含有正、负两种选择性标记。首先将这个打靶载体转染 ES 细胞,然后用 G418 来筛选 neo 同源重组的细胞。插入的重复序列会自发地进行染色体内的重组,将载体序列、标记基因及一个拷贝的同源序列切除。由于负选择基因被切除,故可用相应的药物作为培养基来筛选发生了染色体内重组的细胞。

**3.3.2 双置换法** St-Onge 等<sup>[9]</sup>提出双置换法,是指设计一种携带有正、负选择标记的置换型载体,将其转染 ES 细胞,通过正向选择筛选出同源重组的细胞。然后将另一个不含任何标记基因而仅有目的基因的载体导入筛选出来的 ES 细胞,再通过负向选择筛选出携带所需突变序列的细胞。

**3.3.3 Cre/LoxP 系统介导的策略** Cre/LoxP 系统是噬菌体 P1 的位点专一性重组系统。Cre 重组酶是重组酶 Int 家族中的成员,能介导两个同向的 LoxP 位点间 DNA 片断的特异性切除。打靶载体的同源序列区含有目的基因片断,以及正、负选择标记,且标记基因的两端连有两个 LoxP 位点,将其转染 ES 细胞后,使 Cre 重组酶在 ES 细胞中短暂表达,这样就导致了 LoxP 位点特异性重组而将 LoxP 之间的 DNA 序列切除,仅余下一个 LoxP,获得无筛选基因的突变。

## 4 基因打靶的筛选策略

由于高等真核生物细胞内外源 DNA 与靶细胞 DNA 序列发生同源重组的机率非常低,相反其发生非同源重组的机率却相当高,比同源重组高出几个数量级。所以要把发生定点整合的细胞从大量随机整合的细胞中筛选出来是一项非常困难的工作。为此在进行基因打靶的过程中建立行之有效的富集方案尤为重要。Martin 等<sup>[10]</sup>在 Hprt 基

因模型研究的基础上,发展起来了多种筛选方法,包括物理筛选法、遗传筛选法。后者又分为正向筛选法和正负筛选法。

**4.1 PCR 筛选方法** PCR 方法可用来筛选基因打靶操作中的阳性克隆。它通过在目的突变基因序列中引入特定的 PCR 引物序列,利用 PCR 方法直接检测转化细胞的 DNA 结构。以特定扩增 DNA 片段的有无,鉴别同源重组细胞克隆。Evans 等<sup>[11]</sup>首先将其应用于小鼠 ES 细胞的 hprt (hypoxanthine guanine phosphorybosyl transferase) 基因突变。

**4.2 启动子缺失筛选** 在基因敲除载体的目的片段中插入启动子缺失的正向选择基因 neo,目的基因片段也不包含该基因的启动序列。考虑到 neo 基因在转化细胞中的有效表达,一般有两种插入方式:一种是以一致的可读框插入目的基因片段中;另一种方法是在 neo 基因翻译起始密码子 5' 上游引入终止序列。前一种方式将在基因组靶位基因启动子的作用下表达 neo 基因融合蛋白,使转化细胞具有 G418 抗性;后一种办法通过核糖体重新启动或翻译起始表达独立的 neo 基因产物,转化细胞同样获得 G418 抗性。启动子缺失方法可能是使用频率最高且最为可靠的一种方法。Bradley 等<sup>[12]</sup>在小鼠 ES 细胞中对 N-Myc 基因进行了定点突变,在 G418 抗性细胞中得到了 20% 的同源重组克隆。Schwartzberg 等<sup>[13]</sup>也采用同样的方法对小鼠 ES 细胞 c-Abl 基因进行了基因敲除。另一种变通的方式就是根据要打靶的基因来选择合适的供体细胞系。Doetschman 等<sup>[14]</sup>在 neo 基因前加入内部核糖体启动序列的载体构建策略,可在重组子中表达 neo,从而获得 G418 抗性。

**4.3 poly-A 缺失筛选** 当打靶基因不能被诱导表达时,可考虑用多聚腺苷酸 A (poly-A) 缺失打靶策略。PolyA 缺失筛选的载体设计与启动子缺失的设计类似。Poly-A 缺失的正向选择基因 neo 位于载体的目的片段中,neo 基因因缺失转录终止信号,起表达在转录水平受到抑制。在同源重组的细胞中,neo 基因利用基因组靶位基因的转录终止信号,得到有效表达,从而使阳性细胞获得 G418 抗性;非同源重组的细胞中,因存在 neo 的障碍,不能产生 G418 抗性,从而实现同源重组转化细胞的富集。

**4.4 正负筛选策略** 在打靶载体的同源区内的一个外显子中部插入一个正选择基因(如 neo 基

因),它既可使靶基因失活,又可作为选择标记;在同源序列与非同源序列之间插入负选择基因(如 HSV 胸腺激酶基因,HSV-tk)。运用 G418 正向选择时,发生重组的 ES 细胞因 neo 对 G418 有耐受性而存活。其中发生同源重组细胞的非同源片段(HSV-tk)将被切除,而发生随机整合细胞则由于 tk 的存在而被培养基中的丙氧鸟苷杀死。这个系统可以同时使用于选择标记基因和非选择标记基因的打靶操作。正负筛选系统不受靶位基因功能和表达情况的影响,克服了正向筛选方法在这方面的局限。基因打靶载体采用置换型载体,正向选择基因 neo 插入载体的目的片段中,负选择基因 HSV-tk (Human Semian Virus-thymidine kinase)置于目的片段的外侧。Mansour 等<sup>[15]</sup>已在小鼠 ES 细胞中完成了 hprt、int-2、hox1.2、hox1.3 等基因打靶。但筛选过程中的细胞因子可能会降低克隆的效率。

## 5 条件性基因打靶

它是指直接灭活 ES 细胞中的靶基因。目前有两种操作方法将其应用到 Cre-loxP 系统:①在构建打靶载体时,将标记基因放在靶基因内部,标记基因的两侧放上相同方向排列的 loxP 序列,可以在细胞水平上用 Cre 重组酶表达质粒转染中靶细胞,通过识别 loxP 位点将抗性标记基因切除;②在个体水平上将打靶杂合子小鼠与 Cre 转基因小鼠杂交,筛选子代小鼠就可得到删除外源标记基因的条件性敲除小鼠。目前也多采用 Cre-loxP 重组系统。Doetschman<sup>[16]</sup>和 Kowalczykowski 等<sup>[17]</sup>研究发现,在哺乳动物细胞中 Cre 重组酶也同样能引起 DNA 联合和位点特异性重组。

利用 Cre-loxP 重组系统进行条件性基因剔除的程序如下:(1)用常规性基因剔除方法将一段新构建的 DNA 序列整合至内源基因组,在此新构建的 DNA 序列中,在可选择性标记基因和正常基因片段的两侧都连有 loxP 位点;(2)经过基因剔除的 ES 细胞被一个编码 Cre 重组酶载体迅速转染。Shulman 等<sup>[18]</sup>认为制备在靶基因的两侧带有能被重组酶识别位点的转基因小鼠,再将这两种特定表达的小鼠进行交配,可获得所需的条件性基因打靶小鼠。此外,将 Cre 基因置于可诱导的启动子控制下,通过诱导表达 Cre 重组酶而将 LoxP 位点之间的基因切除,从而实现时空特异性的基因打靶。目

前可利用的组织特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠还很有限,Cre-LoxP 系统的应用还将依赖于更多组织特异性标志基因的发现以及人工调控基因表达系统还有待于进一步研究<sup>[19]</sup>。

## 6 基因打靶技术的应用

**6.1 基因功能和基础理论研究方面** 基因打靶技术通过定点改造基因组中特定基因,有可能在细胞水平上研究特定基因的功能和调控机制,从定点突变的干细胞获得突变基因型个体,而在生物体水平了解基因的胚胎发育和生理功能。定点突变细胞和基因突变型个体的获得,为阐明基因的功能提供了最直接的途径。

**6.2 分子免疫方面** 可用基因打靶观察某一基因对免疫细胞发生发展的影响。Robanus 等<sup>[20]</sup>用基因打靶技术破坏了 CD43 基因,结果提高了 T 淋巴细胞的粘附性,为进一步观察和探讨一些免疫机制奠定了基础。

**6.3 在病理模型和基因治疗方面** 自从 Yanez 等<sup>[21]</sup>发现 Alkaptonuria 遗传病以来,研究者们发现许多遗传病都是由于单个基因的突变引起的。Sedivy 等<sup>[22]</sup>用基因打靶技术对小鼠或其它哺乳类动物中此类单基因进行定点突变,就可以为人类该基因缺陷或突变所致的遗传病建立精确的动物模型,已得到 Lesch-Nyhan、Syndrome、Cystic fibrosis 和 Gaucheris 等多种病理模型。为了解这些遗传病的病理生理生化特性及寻找适当的药物和治疗手段,基因靶位操作技术在很大程度上克服了外源基因在基因组中的随机整合可能带来不确定表型的局限,它通过 ES 细胞的体外转染、筛选和胚胎嵌合体途径,获得含特定突变基因的模型小鼠,得到多种病理模型。因靶位操作技术对缺陷基因结构进行精确改正,与功能弥补性基因治疗不同,修复后的细胞表达正常蛋白,不表达错误产物,是一种理想的基因治疗策略。

**6.4 培养优良品种方面** 基因打靶位操作技术的出现,使转基因动植物研制更为精确,外源目的基因将准确插入受体基因组中,定点改造原有的基因功能。随着对基因功能的深入认识和相关技术的不断完善,如干细胞系统和胚胎重建技术,通过基因靶位操作技术定向改造靶位基因,可以获得改良的表型性状。通过基因打靶可以定点地引入优良基因,提高外源基因的稳定性和表达效率,

从而改变动物的遗传特性,提高动物的生产性能,增强其抗病力,最终培育出满足人们需要的高产、优质、抗病新品种。如在反刍动物中将编码朊病毒蛋白的基因(PrPc)敲除,则可使牛和羊具有一定的抵抗疯牛病、羊骚痒症的能力;将牛羊体内的myostatin基因敲除,则会生产出优秀的双肌品种。和传统的育种方法相比,杨晓等<sup>[23]</sup>认为该体系大大缩短了育种周期。

**6.5 生物反应器方面** 传统方法由于位置效应的存在,导致外源基因的表达产物除主要在乳腺表达外,还在其它组织中存在低水平表达,这有可能限制外源基因的表达量。这对一些大动物来说,Hasty等<sup>[24]</sup>认为基因打靶技术通过将外源基因定点整合到靶位点,有效解决了外源基因整合位点不固定和拷贝数不能控制的问题。此外,采用基因打靶-核移植技术可以得到转基因动物,无需筛选,也降低了生产成本且大大缩短了制作周期。2000年,英国PLL公司的科学家将人类AAT( $\alpha$ -抗胰蛋白酶)基因通过基因打靶技术定点整合到羊胎儿成纤维细胞的procollagen基因座,用转基因体细胞生产的克隆羊的每升乳中AAT蛋白的含量达到了650 mg,远远高于显微注射绵羊的18 mg产量的水平。这是世界上第一例通过体细胞介导的基因打靶与核移植技术相结合生产的转基因家畜。2001年,Denning等又研制出 $\alpha$ -1,3-GT(半乳糖基转移酶)和朊病毒双剔除的克隆绵羊,用体细胞介导的基因打靶与核移植技术相结合的转基因方法制备转基因动物可以避免复杂的ES细胞技术,也不经过嵌合体中间步骤,可在体细胞体外培养水平进行整合筛选及基因打靶,有效解决外源基因表达受位置效应的影响。同时利用克隆技术还可以控制性别和缩短生产周期,从而显著降低制备转基因动物的成本,Valancius等<sup>[25]</sup>也认为其具有广阔的应用前景。

**6.6 用于器官移植研究** 在将动物器官移植入人体时,往往会发生免疫排斥现象。如果能借助于基因打靶技术消除异种反应的移植抗原,然后用这些细胞做核供体,生产克隆动物,从而为人类提供更多的动物移植器官。 $\alpha$ -1,3半乳糖苷转移酶(GGTA1)是引起异种移植排斥反应的主要原因。如果将其敲除,则可以实现异种器官移植。赖良学等(2002)应用基因打靶技术在猪胎儿成纤维细

胞中对GGTA1基因进行了成功的敲除,核移植后获得了GGTA1基因敲除猪。同年,PPL公司的Carol等利用体细胞二次基因打靶技术,获得了GGTA1双等位基因敲除猪。

## 7 结语

基因打靶技术的诞生将为人类探求生命的本质提供强有力的工具。作为新兴的遗传工具,它无论是在理论研究还是在实践应用方面都有着广阔的前景。随着人类基因组计划的实施,越来越多的基因被发现,后基因组时代已经到来。人类基因组及多种模式生物基因组序列的测定,产生了编码30 000~40 000个基因的核苷酸序列,其中只有一小部分基因的作用是已知的。解读未知基因的功能、调控机制及相互关系是今后生命科学的一个重要研究内容。基因打靶技术与动物克隆技术相结合为研究基因的功能提供了一个重要的技术平台。这一技术在未来的生物技术应用领域还有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Capecchi M R, Ajclark F. Altering the genome by homologous recombination[J]. *Science*, 2001, 244(4910):1288.
- [2] Lee S J, McPherron A C. Regulation of Myostatin activity and muscle growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16):9306-9311.
- [3] Mansour S L, Thomas K R, Deng C, et al. Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, (87):7688-7692.
- [4] Capecchi M R. Targeted gene replacement[J]. *Scientific American*, 2004, 270(3):52-59.
- [5] Orban P C, Chui D, Marth J D. Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, (89):6861-6865.
- [6] Lakso M, Pichel J G, Gorman J R, et al. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, (93):5860-5865.
- [7] Thomson A J, Mcwhir J. Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis[J]. *Mol Biotechnol*, 2004, 27(3):231-244.
- [8] Orr-weaver T L, Szostak J W, Rothstein R J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, (78):6354-6358.
- [9] St-Onge L, Furth P A. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 24(19):

- 3875-3877.
- [10] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by terato carcinoma stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(12):7634-7638.
- [11] Evans M J, Kaufman M H, et al. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. Nature, 1981, 292(5819):154-156.
- [12] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines[J]. Nature, 1984, (309):255-256.
- [13] Schwartzberg G, Smithies O, Gregg R G, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination[J]. Nature, 2005, 317(6034):230-234.
- [14] Doetschman T, Gregg R G, Maeda N, et al. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells[J]. Nature, 2007, 330(6148):576-578.
- [15] Mansour L S, Thomas K R, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes[J]. Nature, 2002, 336(6197):348-352.
- [16] Doetschman K, Eistetter H. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium embryol [J]. Exp Morphol, 2005, (87):27-45.
- [17] Kowalczykowski S C, Dixon D A. Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli[J]. Microbiol Rev, 2004, 58(3):401-465.
- [18] Shulman M J, Nissen L, Collins C. Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length[J]. Mol cell Biol, 2000, (10):4466-4472.
- [19] Thomas K R, Capecchi M R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors[J]. Mol Cell Biol, 2002, (12):2919-2923.
- [20] Robanus M, e Riele H, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with iso-genic DNA constructs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, (89):5128-5132.
- [21] Yanez R J, Porter A C, Garrod G. Therapeutic gene targeting[J]. Gene Ther, 1998, 5(2):149-159.
- [22] Sedivy J M, Sharp P A. Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(1):227-231.
- [23] 杨晓, 黄培堂, 黄翠芬. 基因打靶技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 10-20.
- [24] Hastly P, Ramirez-Solis R. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells[J]. Nature, 2001, 350(6315):243-246.
- [25] Valancius V, Smithies O. Double-strand gap repair in a mammalian gene targeting reaction[J]. Mol Cell Biol, 2001, 11(9):4389-4397.

## 2009“永顺杯”优秀论文评选启事

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

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

**欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿**

《广东畜牧兽医科技》编辑部

二〇〇九年一月二十六日

# 维生素 D 生物功能的新进展

杨宽民<sup>1,2</sup>, 蒋宗勇<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 维生素 D 除具有调控钙、磷代谢和骨稳态等作用之外, 在其他组织中也发挥多种活性作用, 如调控免疫系统和调节细胞增殖与分化等方面的新作用。维生素 D 受体 (VDR) 除了在其传统组织如骨、肠道和肾脏中发现以外, 还在众多组织中被发现。此外, 这些组织中亦含有酶 CYP27B1, 其可使维生素 D 循环形式 25-OH-D<sub>3</sub> 转化生成 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 在非肾组织中的代谢与肾脏不同, 且 VDR 介导的转录活性调控作用也是细胞特异性的, 因而维生素 D 的新作用具有细胞特异性, 这为维生素 D 及其类似物提供了许多新的临床应用依据, 但其非传统作用也受到维生素 D 传统作用的限制, 如高血钙和高尿钙。

**关键词:** 维生素 D; 免疫调控

**中图分类号:** S816.72

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0008-03

在过去几十年, 人们已逐渐认识到维生素 D 具有调控钙、磷代谢和骨稳态等作用, 但随着研究的不断深入, 发现机体大多数组织中存在维生素 D 活性代谢物 1, 25 二羟基维生素 D<sub>3</sub> (1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 的作用受体, 即维生素 D 受体 (VDR), 认为维生素 D 在这些组织中也能发挥多种活性作用, 如调控免疫系统和细胞增殖与分化等作用<sup>[1]</sup>。此外, 目前除肾脏外, 其它组织中也含有 1 $\alpha$ -羟化酶 (由细胞色素 p450-CYP27B1 编码), 它可使维生素 D 主要循环形式 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>) 转化为 1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>[2]</sup>。

## 1 来源及代谢

维生素 D<sub>3</sub> 来源于两个途径: 一是在阳光或紫外光照射下, 存在于大多数高级动物的表皮或皮肤组织中的维生素 D 原 (7-脱氢胆固醇) 可经过光化学反应转化成维生素 D<sub>3</sub>; 二是通过食物来提供。维生素 D<sub>3</sub> 被维生素 D 结合蛋白 (DBP) 转运至肝脏, 经肝脏线粒体和微粒体中 25-羟化酶 (其由细胞色素 p450-CYP27A1 编码) 催化作用转化为 25-OH-D<sub>3</sub>, 后者是维生素 D 的主要循环形式, 且其血清水平被认为是反映维生素 D 状况的可靠指示剂。随后 25-OH-D<sub>3</sub> 经线粒体 1 $\alpha$ -羟化酶 (由 p450-CYP27B1 编码) 作用进一步转化为 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 后者是维生素 D 的活性代谢物, 可发挥多种生物活性, 如增加肠道钙磷吸收、提高骨骼矿化、

诱导免疫细胞分化、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化和抑制血管生成等<sup>[3]</sup>。机体肾脏近端小管是 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的主要生成场所, 但在许多肾脏以外的部位也发现了 CYP27B1, 如免疫细胞、许多组织的上皮、骨和甲状旁腺, 可通过胞分泌或旁分泌方式局部生成 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>[4]</sup>。而生成的 25-OH-D<sub>3</sub> 和 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 可经 24-羟化酶的作用分别分解为 24, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 和 1, 24, 25 (OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, 随后排出体外。

## 2 维生素 D 对免疫系统的调控

早在 1983 年首次发现了维生素 D 及其活性代谢物 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 具有潜在的免疫调节作用, 主要表现在三个方面: ①VDR 存在于人活化炎症细胞中; ②1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 具有抑制 T 细胞增殖的作用; ③疾病激活巨噬细胞后具有生成 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的能力 (如表达 CYP27B1)<sup>[5]</sup>。VDR 和 CYP27B1 在先天和适应性免疫反应方面都具有重要作用, 在临床上表现出多种影响作用。例如, 维生素 D 缺乏常伴随各种传染病如结核病, 且 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 能使单核细胞杀死分枝杆菌<sup>[6]</sup>。其潜在的作用机制在于: 单核细胞经分枝杆菌脂肽激活后可表达 CYP27B1, 使循环 25-OH-D<sub>3</sub> 转化生成 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 后者反过来诱导 cathelicidin (增强杀死分枝杆菌作用的一种抗菌肽) 的生成。而 25-OH-D<sub>3</sub> 缺乏则不能完成这一过程。其次, 研究表明维生素 D 缺乏与多种自身免疫疾病有关, 包括类风湿性关节炎、

收稿日期: 2009-04-20

基金项目: 公益性行业科研专项 (3-26)



系统性红斑狼疮、1 型糖尿病、实验性变应性脑脊髓炎、炎性肠病和自身免疫前列腺炎等<sup>[7]</sup>。

**2.1 对适应性免疫的作用** 适应性免疫反应:T 和 B 淋巴细胞分别生成细胞因子和免疫球蛋白, 特异性地抵抗由巨噬细胞和树突状细胞提呈的各种抗原。维生素 D 可对适应性免疫系统发挥抑制作用。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 B 细胞增殖和免疫球蛋白的生成, 且延迟 B 细胞前体向浆细胞的分化<sup>[8]</sup>。此外, 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 T 细胞增殖, 尤其是 Th1 细胞, 后者能生成 IFN- $\gamma$  和 IL-2, 且可激活巨噬细胞。这些作用进一步抑制了抗原提呈到 T 淋巴细胞及其募集 (IFN- $\gamma$  的作用), 以及 T 淋巴细胞的增殖 (IL-2 的作用)。相反, 也降低 IL-4, IL-5 和 IL-10 生成, 从而使 Th1/Th2 平衡向 Th2 细胞移动<sup>[9]</sup>。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 也能增加 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>25</sub><sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (Treg), 表现为 FoxP3 表达及 IL-10 生成的增加<sup>[10]</sup>。调节性 T 细胞 (Treg) 通过生成的 IL-10 可抑制 Th1 发育。这些对 T 细胞增殖和分化的作用至少部分是由于 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 降低了树突状细胞的抗原提呈能力。最近研究发现 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对 Th17 发育及功能产生影响, 且先前认为 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对自身免疫疾病的作用是由于其抑制了 Th1 发育及功能所引起, 但目前发现其可能部分由于抑制 Th17 发育及功能所引起<sup>[10]</sup>。

**2.2 对先天免疫的作用** 先天免疫反应涉及了多形核受体 (PMNs)、单核细胞与巨噬细胞, 以及多种上皮细胞包括表皮、牙龈、肠道、阴道、膀胱和肺中 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 的激活。TLRs 是跨膜病原识别受体, 与传染原脱落的特异性细胞膜模式 (PAMP) 相互作用, 从而引发宿主先天免疫反应。TLRs 被激活后诱导抗菌肽和活性氧簇杀死微生物。Cathelicidin 是众多抗菌肽之一, 在骨髓和上皮细胞中表达并受 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的诱导。早期研究表明巨噬细胞和上皮细胞都可对 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 产生反应并生成 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (因其都含有 VDR 和 CYP27B1)<sup>[11,12]</sup>。通过巨噬细胞抗菌肽或角质化细胞表皮损伤后对 TLR2 的激活, 引起 CYP27B1 表达的增加, 从而在底物 (25-OH-D<sub>3</sub>) 充足时刺激 cathelicidin 的表达<sup>[13,14]</sup>。缺乏底物 (25-OH-D<sub>3</sub>)、VDR 或 CYP27B1 都会削弱这种作用。先天免疫广泛分布并作用于淋

巴系统以及上皮, 如表皮、胃肠道上皮、膀胱、阴道、肺等组织, 流行病学研究表明维生素 D 缺乏会增加这些组织感染的风险<sup>[15]</sup>。

### 3 维生素 D 对细胞增殖与分化的调控

现已在临床应用中发现 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 具有化学预防和抗癌活性治疗作用。在化学预防方面的研究表明 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 可延迟前列腺上皮肉瘤样变 (PIN) 的发生, 且早期添加其抗肿瘤活性更高<sup>[16]</sup>。此外, 在鳞状细胞癌 (SCC)、前列腺肿瘤、卵巢、乳房和肺癌方面的研究表明 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 及维生素 D 类似物具有显著的抗癌作用<sup>[3]</sup>。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 及其类似物通过与 VDR 结合而发挥调控增殖、细胞凋亡和血管生成的作用。

**3.1 抑制增殖和诱导分化** 经 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 培养后, 角质化细胞和髓细胞性白血病细胞的生长抑制伴随着其进一步的分化<sup>[17]</sup>。然而, 增殖与分化的调控并不总是同时的, 细胞增殖或分化的程度具有细胞特异性。大多数表达功能性 VDR 的细胞经 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 培养后, 引起细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞周期中的积聚<sup>[18]</sup>。现已表明 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 直接介导了周期素依赖性激酶抑制因子的激活 (如 p18、p19、p21 和 p27), 周期素 D1 表达的抑制, 以及周期素与周期素依赖性激酶复合物活性的下调, 最终干扰细胞周期进程<sup>[19]</sup>。但 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 也可能通过干扰由 TGF- $\beta$ 、表皮生长因子、IGF、前列腺素和 Wnt 配体起始的信号传导途径, 以及其他促有丝分裂信号传导途径 (如 ERK/MAPK 途径和 c-myc) 来抑制细胞生长<sup>[3]</sup>。

**3.2 诱导细胞凋亡** 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 诱导多种肿瘤模型中的细胞凋亡, 包括乳房、结肠和前列腺癌, 但潜在的作用机制仅得到部分地阐明<sup>[20]</sup>。促凋亡和抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族的相对表达与细胞分布的变化, 以及随后线粒体释放的细胞色素 C 都有助于 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对细胞凋亡的诱导作用, 但取决于细胞类型。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 也表现出与其它信号传导途径相互作用 (如 IGF, TNF- $\alpha$ ), 从而诱导细胞程序性死亡<sup>[21]</sup>。

**3.3 抑制血管生成** 由于血管生成是实体瘤生长的基本需要, 因此 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抗血管生成活性是其肿瘤抑制活性的作用机制。在体外和体内实验模型中, 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 表现出抑制血管生成的作用<sup>[22]</sup>。这种抗血管生成活性被认为是通过抑制肿瘤内皮

细胞增殖或抑制血管生成因子 (如血管内皮细胞生长因子、TGF- $\alpha$  和上皮细胞生长因子) 介导的。

#### 4 维生素 D 的作用机制

维生素 D 生物功能的发挥是通过其活性代谢物 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  介导的, 后者的作用机制与其他类固醇激素相似, 而 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  的多种生物活性是通过与 VDR 的结合来介导。VDR 是核激素受体超家族的成员, 包括类固醇、甲状腺激素类和维甲酸类受体。1, 25(OH) $_2$ D $_3$  与 VDR 结合后与维甲酸 X 受体 (RXR) 形成异二聚体, 后者与靶基因启动子区特异性 DNA 序列 (维生素 D 反应元件, VDRE) 相互作用, 从而激活或抑制靶基因转录。但转录的调控过程需募集辅调控因子: 辅刺激因子和辅抑制因子。对于转录激活来说, 现已确定存在两种主要辅刺激因子: 核受体激活复合物 (SRC, 由 p160 家族 SRC1、2 和 3 辅刺激因子组成) 和维生素 D 受体作用蛋白复合物 (DRIP)。这些辅刺激因子复合物与 VDR 的 C 端 AF2 区相互作用, 随后与配体结合并募集 CREB 结合蛋白 (CBP) 和其它组蛋白乙酰基转移酶 (HATs) 与甲基转移酶 (MeTs) 到 VDR, 最终形成多亚基复合物启动转录<sup>[5]</sup>。而辅抑制因子则阻断 VDR 介导的转录活性, 其中包括核辅抑制因子 (NcoR) 和维甲酸与甲状腺受体的静默介质 (SMRT)。这些辅抑制因子在无 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  存在时与 VDR 特异性结合, 且当 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  结合后募集辅刺激因子到 VDR 时, 其被移位。此外, 其它转录因子也可调控 VDR 活性。 $\beta$ -连环蛋白结合到 VDR 后可调控其对多种基因的诱导作用<sup>[23]</sup>。同样地, YY1 和 CCAAT 增强子结合蛋白  $\beta$  和  $\delta$  也可调控 VDR 介导的转录过程<sup>[24]</sup>。由于这些辅调控因子在不同组织中分布不同, 因而 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  和 VDR 的作用具有组织特异性。

#### 5 结语

VDR 与 CYP27B1 的广泛分布使得维生素 D 不仅具有调节矿物质代谢和骨稳态方面的传统作用, 而且在许多组织中也发挥多种非传统作用。目前, 大量研究已证实了维生素 D 通过对宿主免疫系统的调节 (先天和适应性免疫) 而具有抗细菌感染和治疗各种自身免疫疾病, 起免疫调节剂作用, 但由于其潜在传统作用如引起高血钙和高尿钙, 从而限制了其在临床上的应用。其次, 维生素

D 对细胞增殖及分化的调控作用表明了其具有抗癌活性, 可临床用于某些癌症的预防及治疗, 但维生素 D 具有组织或细胞特异性。因此, 随着研究的不断深入, 人们对维生素 D 非传统作用机制的逐步了解, 为开发维生素 D 及其类似物作为免疫调节剂或抗癌剂在临床应用方面提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Maalouf N M. The noncalcitropic actions of vitamin D: recent clinical developments[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(4): 408-415.
- [2] Norman A W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health[J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(2): 491S-499S.
- [3] Deeb K K, Trump D L, Johnson C S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(9): 684-700.
- [4] Hewison M, Burke F, Evans K N, et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D $_3$ -1 $\alpha$ -hydroxylase in human health and disease[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, (103): 316-321.
- [5] Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(1): 26-34.
- [6] Ustianowski A, Shaffer R, Collin S, et al. Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London[J]. *J Infect*, 2005, (50): 432-437.
- [7] Luciano Adorini, Giuseppe Penna. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system[J]. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2008, (4): 404-412.
- [8] Chen S, Sims G P, Chen X X, et al. Modulatory effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$  on human B cell differentiation[J]. *J Immunol*, 2007, (179): 1634-1647.
- [9] Bikle D D. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(4): 348-352.
- [10] Daniel C, Sartory N A, Zahn N, et al. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th)1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile[J]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2008, (324): 23-33.
- [11] Adams J S, Sharma O P, Gacad M A, et al. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D $_3$  by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis[J]. *J Clin Invest*, 1983, (72): 1856-1860.

(下转第 28 页)

# 细胞高密度培养关键技术研究进展

蔡植松, 齐冬梅, 张毓金

(广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

**摘要:** 细胞高密度培养是指在人工条件下模拟体内生长环境, 使细胞在细胞生物反应器中高密度生长, 用于生产生物制品的技术。本文就细胞高密度培养技术中的细胞株筛选及改造、无血清培养基选择及适应、生物反应器、微载体选择等可能影响细胞存活率以及产物表达率的关键技术进行综述。

**关键词:** 细胞培养; 高密度; 微载体; 生物反应器

**中图分类号:** S814.8

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0011-03

细胞高密度培养是指在人工条件下模拟体内生长环境, 在细胞生物反应器中高密度生长, 用于高效生产细胞培养相关生物制品的技术。在过去几十年里, 细胞高密度培养技术不断更新发展, 从使用转瓶、CellCube 等贴壁细胞培养, 发展为利用生物反应器结合微载体、悬浮高密度细胞培养技术<sup>[1]</sup>。以下对细胞高密度培养的主要关键技术: 细胞株筛选及改造; 无血清培养基选择及适应; 生物反应器、微载体选择等可能影响细胞存活率以及产物表达率进行综述。

## 1 高密度培养的细胞特性研究及改造

细胞是病毒的表达载体, 细胞质量直接影响蛋白的表达量。通过细胞的筛选、驯化、改造获得适合高密度生长、能分泌大量目标产品的细胞株(系)至关重要<sup>[2]</sup>。细胞单克隆技术是细胞改造、驯化的基本手段, 但该技术存在效率低、工作量大等弊端。20世纪80年代以后, 基因工程技术和细胞融合技术的发展、应用为适合高密度培养细胞的筛选、驯化以及特性改造提供了更有效的手段<sup>[3]</sup>, 如通过导入细胞凋亡抑制基因 b1-2 基因到细胞中预防并控制细胞凋亡, 提高细胞存活率; 通过导入特异生长因子的基因, 改变细胞的能量代谢途径, 使细胞能更充分更合理地利用营养物质, 减少细胞特定营养成分的消耗以及有害代谢废物的积累, 或使细胞能合成自身生长必需的物质来满足细胞生长需要; 通过导入增加启动子使细胞目的蛋白产量达到更高的层次, 使细胞高密度培养更具应用价值<sup>[4]</sup>。

## 2 无血清培养基的研究

细胞培养基是细胞赖以体外生长、增殖、分化的重要因素, 除去或尽量减少培养环境中外源因

子的污染, 减少外源蛋白的影响使副反应更低, 生产的生物制品更安全是所有生物技术工作者一直努力的方向。但通常细胞的生长均需要有血清的存在, 如细胞的贴壁性、活性等都有赖于血清的存在。血清培养基的主要弊端是存在潜在的污染源, 如使用小牛血清存在牛 BVDV 污染的风险<sup>[5]</sup>, 并且不同批次血清的蛋白含量及质量差异大, 易造成产品质量的不均一性, 给下游的产品纯化等造成了极大的不便及增加生产成本<sup>[3]</sup>。通过对体液的分析, 确定细胞的主要营养成分组成, 试验发现只要在细胞培养基中添加适合细胞生长的必要成分, 如纤连蛋白、转铁蛋白、胰岛素和表皮生长因子等, 多种细胞也可在无血清供应的情况下生长, 如 CHO、杂交瘤及重组骨髓瘤细胞等<sup>[6]</sup>; 无血清培养基的应用还能提高某些细胞的生长密度及目的产物产量, 同时还具有选择性地控制及避免成纤维细胞过度生长的优势<sup>[7]</sup>。无血清培养基的应用可提高生物制品质量及安全性, 生产流程更简单, 生产效率更高、生产成本更低。

## 3 生物反应器

在生物制品生产中, 细胞高密度培养已越来越受到重视, 而细胞高密度培养的最主要设备就是生物反应器<sup>[8]</sup>。理想的细胞生物反应器, 能够很好地满足细胞高密度增殖的需要, 同时配合科学合理的在线监控系统, 及时反映细胞的生长状况, 使细胞高密度培养更加科学合理, 保证细胞目标产品高效分泌。近年来广泛应用的细胞高密度培养生物反应器主要有以下几种:

**3.1 机械搅拌式** 机械搅拌式是开发较早也是在研究、中试和生产中应用广泛的一类生物反应

器。电动马达带动的不锈钢搅拌系统实现培养物的混匀,在罐体顶端还有一些传感器,可以连续监测培养物的温度、pH、DO、葡萄糖消耗、氨等参数。这种生物反应器培养规模较大,配合适宜的微载体培养模式,可使培养细胞密度达到  $10^7$  cells/mL 以上<sup>[8]</sup>。搅拌式生物反应器的最大优点是能培养各种类型的细胞,培养工艺容易放大,产品质量稳定,非常适合于工厂化生产,而且消毒方便,在生物制品开发中潜力很大。但机械搅拌会产生一定剪切力,对细胞造成某种程度上的损伤<sup>[7]</sup>。

**3.2 气升式** 气升式生物反应器在结构上和搅拌式大同小异,主要区别是用气流代替不锈钢叶片进行搅拌,通气和搅拌一次性完成,培养环境比较温和,并且产生的剪切力相对温和,对细胞损伤较小,但价格相对昂贵以及放大生产存在一定的技术局限<sup>[9]</sup>。

**3.3 中空纤维** 中空纤维是开发较早和不断改进的一类生物反应器。其特点是细胞培养环境温和,培养细胞密度较高( $10^7 \sim 10^8$  cells/mL)<sup>[10]</sup>,产品较容易分离纯化。但是这种生物反应器的培养环境不够均一,在一定程度上影响了产品质量稳定,并且工艺不容易放大,反应器本身的消毒和重复使用也相对困难<sup>[11,12]</sup>。

**3.4 空间生物反应器** 20世纪90年代中期,美国宇航局开发了一种使培养物的重力向量在旋转过程中产生随机化,导致一定程度的重力降低,使细胞处于一种模拟自由落体状态,以此模拟微重力环境的回转式生物反应器,被誉为空间生物反应器<sup>[13]</sup>。回转生物反应器由于没有搅拌剪切力影响,细胞可在相对温和的环境中进行三维生长,同时随机化的重力向量可能直接影响细胞的基因表达,或者间接促进细胞产物分泌。通过模拟体内的细胞与细胞相互作用及细胞与基质相互作用的生理环境,为细胞培养提供一个温和、立体、营养全面的生长环境,以获得高密度细胞,高产量、高质量的产物<sup>[14]</sup>。

**3.5 其它生物反应器** 近年来在组织与细胞工程领域用到的还有流化床生物反应器、Petri 碟生物反应器、脉动式生物反应器、摇床式生物反应器、填充床生物反应器等,但这些生物反应器应用不普遍<sup>[13]</sup>。

## 4 生物反应器的相关技术

依托生物反应器为细胞生产设备,配合微载体

培养、悬浮培养技术,结合精确有效的在线监控系统、工艺控制手段生产优质高效、高产量的产品<sup>[8]</sup>。

**4.1 细胞培养工艺技术研究** 细胞的培养方式主要有贴壁培养、悬浮培养、固定化培养等<sup>[15]</sup>,而生物反应器是细胞高密度培养的基本装置,为提高细胞的生产效率,还需要为细胞培养选择合适的培养模式。常用的细胞培养方法有分批培养、补料分批培养、半连续培养、连续培养等。属于补料分批培养的流加培养和灌流培养是细胞培养模式中最常用的两种操作方式。灌流培养是一个带有细胞循环的连续培养,通过不断地向培养物中补充新鲜培养液,维持反应器中的营养物浓度不会成为细胞生长的限制因素;同时不断地抽走培养液,带走细胞生长过程中的代谢有害产物,使得代谢产物不会抑制对细胞的生长代谢,培养细胞可以达到很高的密度。并且产物在反应器中的停留时间较短,不易受到降解而破坏,有利于提高产物的收率。通过分离纯化,就能源源不断地获得细胞产品,尤其适于表达型细胞培养的工厂化生产<sup>[16]</sup>。采用灌流培养操作可系统化、自动化,降低污染发生的机率。

流加培养最大的特点是能够调节培养环境中营养物质的浓度,既可以避免过高的初始营养成分浓度产生的抑制,又防止营养成分被耗尽后产生的限制作用。流加操作简单、灵活,避免分批操作的许多缺点,已成为细胞高密度培养中最有竞争力的方式之一。

**4.2 微载体的选择** 细胞高密度培养重要的技术就是微载体的应用,大多数细胞都是贴壁依赖性细胞,微载体技术一定程度上克服了转瓶培养的不足,兼具单层培养和悬浮培养的优势,均相培养,容易放大,环境条件(温度、pH和CO<sub>2</sub>等)容易测量与监控,重现性好;并且微载体的表面积/体积(S/V)大,培养基利用率较高,单位体积培养液的细胞可达到更高密度;此外微载体培养系统占地面积和空间小,简化细胞收获过程,减少人力、物力的投入,提高生产效率,降低生产成本<sup>[17,19]</sup>。

为特定细胞选择合适的微载体是微载体培养技术的关键前提,细胞成功地在微载体上扩展的能力随细胞系和培养基的不同而变化<sup>[1,18]</sup>,应根据各种细胞特性选择最佳电荷密度的微载体或对微载体表面特性的改进,提高细胞贴壁率的同时增加细胞的移动性,不干涉代谢产物的合成和分泌,

同时满足操作简便、系统稳定、经济合理、对细胞无毒性,减少微载体在培养过程中因为互相碰撞对细胞的机械损伤,对营养物质吸附低等的生物相容性好等方面的要求。

**4.3 培养过程的在线监控** 细胞培养过程的在线检测技术是当今国外在此领域的研究热点。在细胞高密度培养中,及时反映细胞生存环境中的各种参数变化能够使流加、灌注培养更趋于合理化、科学化,是创造适合细胞生存的最佳环境、减少污染,获得高细胞密度以及高质量、高产量产品的重要保障。目前很多现代化仪器已被用于细胞培养的监测和控制,如流式细胞光度计、电子显微镜、核磁共振仪、质谱仪<sup>[18]</sup>、高效液相色谱以及流动注射分析<sup>[19]</sup>等,在培养过程中对温度、pH值、溶解氧浓度进行在线分析,有效控制。另外分析软件的开发应用对细胞高密度培养也有重要意义,如估测目前和未来生物反应过程中葡萄糖的吸收率及乳糖的生成率的软件<sup>[20]</sup>,使细胞高密度培养过程的状态监控更加及时、准确。高效的监控系统结合高效的自动控制技术,提高了细胞培养的自动化、精巧化水平。

## 5 结语

细胞高密度培养代替转瓶培养是现代生物技术发展的必然趋势,应用生物反应器进行细胞高密度培养生产生物制品,生产效率高,所需空间小,大大降低了劳动强度,节约大量的人力、物力,改善员工的工作环境。最重要的是使细胞密度大大提高,高的细胞产率意味着高的目的产品产量和质量。目前细胞高密度培养仍然是我国生物制品难以跨越的“门槛”,只有对细胞高密度培养关键技术进行不断的细化、改进,科学系统地运用,才能对我国传统的生物制品生产技术进行升级和科技创新。

## 参考文献:

- [1] 李寅,高海军,陈坚.高细胞密度发酵技术[M].北京:化学工业出版社,2006.
- [2] Reed J C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. Cell Biol, 1994, (124):1-6.
- [3] Voige A, Ziml F. Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flecks using a protein-free medium with microcarrier[J]. J Biotechnol, 1999, 68(2-3):213-226.
- [4] Sinacane M S, Drapeau D, Adamson S K. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media[J]. Mol

- Biotechnol, 2000, 15(3):249.
- [5] 宫飞,朱明龙.微载体培养 Marc-145 细胞实验条件的优化[J].微生物学免疫学进展,2007,35(1):372-375.
- [6] 王常勇.采用微载体技术大规模培养组织工程种子[J].细胞生物医学工程与临床,2002,6(1):51-54.
- [7] Chen Zhaolie, Pink Lutkemeyer, Kai Iding. High-density culture of recombinant Chinese hamster ovary cells producing prothrombin in protein-free medium [J]. Biotechnology Letters, 2001, (23):767-770.
- [8] Shi Y, Rgu D D Y, Performance S H. Performance of mammalian cell culture bioreactor with a new impeller design[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40(2):260-264.
- [9] 李学梅,林建平,刘娥,等.固定化米根酶发酵制 L-乳酸[J].菌物系统,1998,17(4):318-32.
- [10] Vincenza C, Siefano C, Gabrieli I. A theoretical analysis of transport phenomena in a hollow fiber membrane bioreactor with immobilized biocatalyst[J]. Journal of membrane Science, 2002, (206):217-241.
- [11] 刘轶,朱国强.动物细胞培养及微载体技术研究进展[J].吉林农业大学学报,2007,29(2):203-206.
- [12] Haut B, Amor H B, Coulon L, et al. Hydrodynamics and mass transfer in a Couette-Taylor bioreactor for the culture of animal cells[J]. Chemical Engineering Science, 2003, (58):777-784.
- [13] 胡江,陶祖莱.组织工程研究进展[J].生物医学工程学杂志,2000,17(1):75-80.
- [14] Schwarz R P, Goodwin T J, Wolf D A. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating wall vessels: an application in simulated microgravity[J]. J Tissue Culture Methods, 1992, (14):51-58.
- [15] 过琴媛,王辉.微载体培养动物细胞技术的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2007,35(1):73-75.
- [16] 韩德胜,李振平,李薇,等.微载体规模化培养细胞的研究[J].生物学免疫学进展,2005,33(3):34-36.
- [17] 何春艳,陈列胜,吴书军,等. Vero 细胞和流感病毒在无血清条件下的微载体培养[J].中国生物制品学杂志,2007,2(20):2.
- [18] Anthony M, Susan T, Sean N, et al. Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Biotechnol Bioeng, 1994, (44):563-585.
- [19] Campmajo C, Cairo J J, Santeliu A, et al. Determination of ammonium and glutamine in hybridoma cell cultures by sequential flow injection analysis[J]. Cytotechnology, 1994, (14):233-246.
- [20] Dowd J, Weber I, Rodriguez B, et al. Predictive control of hollow-filter bioreactors for the production of monoclonal antibodies[J]. Biotechnol Bioeng, 1999, (63):484-492.

# 矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡产蛋性能比较研究

张国杭

(广东省畜牧技术推广总站, 广东 广州 510500)

**摘要:** 本试验对广东地区矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡等品种种鸡产蛋性能进行了比较研究。结果表明,矮脚黄鸡的适应性、抗病性较强,死淘率低(6.31%),料蛋比低(5.05),产蛋整齐性好,从开产到产蛋率达80%的天数短(25天);新兴黄鸡产蛋期产蛋数高达182.44枚,破蛋率低,为1.55%;广西三黄土鸡开产日龄早(148日龄),日采食量低(164.83g),产蛋期只总耗料量为41.37kg。矮脚黄鸡对广东地区高温、多湿的环境适应性较强,适合在广东地区饲养。

**关键词:** 矮脚黄鸡; 新兴黄鸡; 广西三黄鸡; 产蛋性能

**中图分类号:** S831.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0014-02

1988年“粤黄882”配套系取得成功,极大地推动了广东地区优质鸡新品种的选育工作。目前,广东地区的康达尔黄鸡I号、江村黄鸡I号与II号、新兴矮脚黄鸡与新兴黄鸡II号、岭南黄鸡1号和2号等7个配套系已通过国家级的品种审定<sup>[1]</sup>。矮脚黄鸡、新兴黄鸡是以新兴土杂鸡、新兴乌骨鸡、石岐杂鸡、以色列隐性白鸡和法国新安康红矮脚鸡等为素材培育而成<sup>[2]</sup>。矮脚黄鸡产蛋率高、繁殖力强、耗料少、饲养空间小、抗马立克氏病能力强<sup>[3]</sup>;新兴黄鸡生产性能优良,抗逆性强,肉质酷似土鸡,毛色纯黄,体型一致<sup>[4]</sup>。近年来优质优价的市场经济刺激了土鸡的生产发展,清远麻鸡、信宜走地鸡、广西三黄鸡、江西土鸡和湖南土鸡等纷纷进入广东活鸡市场<sup>[5]</sup>。鸡种资源的不断增多,使得许多优良品种在不同的饲养条件下,并未真正发挥出优良的生产性能。本试验对广东地区矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡等品种种鸡产蛋性能进行了初步研究,为今后广东地区规模化种鸡生产在品种选择上提供了参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验动物及试验设计** 选择达开产日龄种用矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡等三个品种共3540只种鸡,分成三组,每组3个重复。试验期从种鸡开产日龄起至产蛋率低于50%。试验分组见表1。

表1 试验分组

品种	试验期(2007年)	数量(只)
矮脚黄鸡	3-11月	1210
广西三黄鸡	3-11月	1180
新兴黄鸡	4-12月	1150

**1.2 试验日粮** 采用三阶段饲养,基础日粮组成及营养水平见表2。

**1.3 饲养管理** 湿帘式有窗鸡舍,强制通风,自然采光(适当补充人工光照,保证每天光照16h)。采用笼养,母鸡每笼2~3只,饲喂自配全价饲料,自由采食,自由饮水,饲养期间严格执行免疫程序。

**1.4 资料收集** 每天记录日耗料量、鸡群活动情况、发病情况、死亡鸡数、淘汰鸡数、畸形蛋数、破蛋数、蛋重、产蛋量等。

表2 基础日粮组成及营养水平

产蛋周龄	原料配合比例(%)							营养水平 <sup>1)</sup>	
	玉米	麸皮	豆粕	棉粕	菜粕	石粉	预混料	代谢能(MJ/kg)	粗蛋白(%)
1~3周	67	-	21	5	-	4	3	11.31	16.5
3~20周	62	-	18	6	3	8	3	11.31	16.5
20~38周	60.5	3	18	5	2	8.5	3	11.10	16.0

1): 营养水平为理论计算值

1.5 统计方法 采用 EXCEL 和 SAS8.1 统计软件对数据进行统计分析,数据采用平均值±标准误形式表示,多重比较采用 Duncan 多重比较分析方法。

## 2 试验结果与分析

矮脚黄鸡、新兴黄鸡、广西三黄鸡等各项产蛋

性能指标见表 3。由表 3 可知,新兴黄鸡产蛋期平均产蛋数最高,为 182.44 枚;矮脚黄鸡次之,为 166.86 枚;广西三黄鸡最低,为 149.39 枚。

开产日龄、产蛋率从 5%~50%、5%~90%的间隔天数是评价蛋鸡质量和预见全期产蛋性能的重要

表 3 不同品种种鸡产蛋性能及成活率对比

项 目	矮脚黄鸡	广西三黄鸡	新兴黄鸡
开产日龄(天)	153	148	162
达到产蛋高峰日龄(天)	178	177	190
产蛋高峰持续时间(天)	40	6	50
产蛋天数(天)	251	243	268
只总产蛋数(枚)	166.86 <sup>b</sup> ± 1.552 <sup>d</sup>	149.39 <sup>c</sup> ± 1.198	182.44 <sup>a</sup> ± 1.156
只产畸形蛋率(%)	9.34 <sup>b</sup> ± 1.161	8.30 <sup>c</sup> ± 0.160	10.50 <sup>a</sup> ± 0.244
只产破蛋率(%)	2.40 <sup>a</sup> ± 0.141	2.00 <sup>b</sup> ± 0.075	1.55 <sup>c</sup> ± 0.06
只产正常蛋率(%)	88.26 <sup>b</sup> ± 0.272	89.70 <sup>a</sup> ± 0.194	87.95 <sup>b</sup> ± 0.289
平均蛋重(g)	65.00 <sup>a</sup> ± 1.211	41.00 <sup>c</sup> ± 0.894	61.90 <sup>b</sup> ± 0.821
只总产蛋重(kg)	10.85 <sup>a</sup> ± 0.291	6.125 <sup>b</sup> ± 0.166	11.294 <sup>a</sup> ± 0.189
平均日采食量(g)	217.47 <sup>b</sup> ± 4.859	164.83 <sup>c</sup> ± 2.083	235.79 <sup>a</sup> ± 1.932
只总耗料(kg)	54.59 <sup>b</sup> ± 1.22	41.37 <sup>c</sup> ± 0.523	59.18 <sup>a</sup> ± 0.485
料蛋比	5.05 <sup>b</sup> ± 0.209	6.78 <sup>a</sup> ± 0.209	5.25 <sup>b</sup> ± 0.093
死淘率(%)	6.31 <sup>c</sup> ± 0.140	11.46 <sup>a</sup> ± 0.407	10.08 <sup>b</sup> ± 0.244

1): 产蛋率达 80% 以上视为达到产蛋高峰; 右上角同行同一批字母相同者表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 字母不同者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

参考指标,两者呈负相关<sup>[6]</sup>。矮脚黄鸡从开产到产蛋率达 80% 的时间最短,为 25 天,产蛋整齐度较好,新兴黄鸡相比稍次,为 28 天。在相同饲养管理和无疾病、无强应激的条件下,新兴黄鸡和矮脚黄鸡产蛋率达 80% 以上的持续时间分别为 50 天和 40 天,与广西三黄鸡相比具有较强的优势。矮脚黄鸡的适应性、抗病性较强,死淘率低(6.31%),平均蛋重 65 g,料蛋比为 5.05。广西三黄土鸡日采食量低(164.83 g),产蛋期只总耗料量为 41.37 kg,开产日龄早(148 日龄),但在整个产蛋期产蛋的天数最短,为 243 天。新兴黄鸡产蛋期长,产蛋数多,平均达 182.44 枚/只,且破蛋率低,为 1.55%。

## 3 结论

广东地处我国南部,属亚热带地区,北回归线横穿其大陆中部,大部分地区的气候为南亚热带季风气候类型,是我国光、热、水资源特别丰富的地区<sup>[2]</sup>。热应激不仅使蛋鸡产蛋率下降,蛋重减少,破蛋率增加,而且会导致鸡的抵抗力和免疫力

下降甚至大批死亡,给养禽业造成了巨大的经济损失。矮脚黄鸡因含有 dw 基因,其体重小,饲料报酬高,耐热能力强,能较好地适应广东地区高温、湿热天气。新兴黄鸡饲料报酬高,产蛋期产蛋数多,经济效益较好。因此,广东地区种鸡可重点推广矮脚黄鸡和新兴黄鸡。

## 参考文献:

- [1] 张细权,梁少东,张德祥. 广东优质鸡新品种选育回顾[J]. 中国家禽, 2006, 28(1): 9-11.
- [2] 瞿浩,舒鼎铭,杨纯芬. 广东优质鸡种质资源的现状及发展建议[J]. 广东农业科学, 2004, (6): 4-7.
- [3] 孙宏进. 矮脚黄鸡在优质鸡配套中的应用研究[J]. 中国家禽, 2005, 27(11): 10-13.
- [4] 张顺珍,包承玉,刘明智,等. 新兴黄鸡 2 号不同营养水平日粮饲养试验[J]. 江苏农业科学, 1996, (6): 55-56.
- [5] 魏彩藩. 中国南方优质鸡育种与发展趋势[J]. 中国禽业导刊, 2001, 18(1): 4-5.
- [6] 余成蛟. 不同品种商品蛋鸡生产性能测定分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004, (10): 37-38.

# 规模化猪场保育猪的生产管理技术

刘世强

(广东省中山白石猪场, 广东 中山 528463)

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0016-02

保育阶段在规模化猪场整个养猪流程中处于承上启下的关键作用, 此阶段仔猪的健康成长为此后生长肥育阶段的高速生长打下良好的基础。然而, 对猪本身来说保育阶段却是一生中最为艰难的时期, 原因有三: 第一, 断奶应激。一般规模化猪场采用一次断奶法, 仔猪必须克服由吮吸母乳和依赖母猪的生活转变为采食固体饲料和独立生活的双重打击。第二, 仔猪自身的消化系统和免疫系统的高速生长发育需要大量的营养物质, 这产生两个主要的矛盾: 一是有限的消化能力与大量采食消化固体饲料的矛盾, 二是由被动免疫向主动免疫的艰难转变与高压力的病原侵袭和频繁疫苗注射刺激的矛盾。第三, 饲养方式、分群和环境改变的应激。由少量多餐逐渐过渡到自由采食, 由高档的教槽料向保育料以及后来的小猪料过渡, 生活环境由温暖、舒适和安全的产房变为陌生的保育舍。因此, 保育猪的生产管理工作的重点必须围绕保育猪或者说断奶仔猪的生理和身体的生长发育特点, 创造合适的生长条件。

## 1 帮助仔猪过好断奶关

“三维持、三过渡”, 即维持原栏饲养、维持饲料种类和饲喂方法不变、维持原窝转群和分群, 饲料种类、饲养方式和生长环境的逐渐过渡, 这是非常好的措施, 但是未必能百分之百的实施。这由现实的生产条件限制, 例如按生产计划转群和分群, 保育舍温度的调控等, 然而必须尽量减少应激和保证温暖的环境。必须指出, 断奶前要做好补料和诱食工作, 让仔猪尽早开食, 促进消化系统的发育, 减少断奶换料之后发生腹泻的风险。

## 2 保育舍进猪前的准备

彻底的清洗干净和消毒, 包括网床、栏杆、地面、暗沟、走道、墙壁、门窗、料车、灯泡等, 注意方向要自上往下, 千万不要留有死角, 特别是容易忽

视的供水系统的消毒。维修保育舍的设备, 确保电源、保温以及供水系统等的正常使用, 然后熏蒸消毒。每立方米空间用福尔马林 30 mL、高锰酸钾 15 克和水 15 mL 的比例, 密闭至少 24 h。向产房人员了解猪群的生长健康情况, 做好饲料、药物、用具和确保赶猪通道的通畅等准备工作。

## 3 猪群的管理

**3.1 保温和通风** 总的原则是大环境通风, 小环境保温。随着每天不同时段的气温变化, 适时调控保温与通风。这一点很重要, 尤其是猪群密度较大时。可控温保育舍进猪前提高舍温至 26~28℃, 非控温保育舍要准备好保温板(垫板), 打开保温灯预热, 此后每周降 1~2℃, 直至转出保育舍时约为 20~21℃。确保猪舍可密封无贼风。对于弱小的猪群可多加一个保温灯取暖。

**3.2 进猪及分群** 尽量避免雨天和气温骤然下降的天气转群。夏天避免高温时段, 冬天避免寒冷时段。维持原窝转栏、一窝一栏当然最好, 但多数规模化猪场都是两窝并一栏或者十来头至二十多头一栏, 最好不要超过 25 头/栏, 生产设备较好的场不要超过 35 头/栏, 否则将增加争斗和爆发疾病的风险。网床培育猪群密度建议 0.28~0.32m<sup>2</sup>/头, 地面培育可以适当减少密度, 根据整个生产情况和天气冷热的状况, 适当增减猪群群体大小。分群时按照体重大小、性别来划分, 根据实际情况尽量遵循“拆多不拆少”、“留弱不留强”、“夜并昼不并”的原则。留一个或两个空栏作为护理栏。

为了减少并群的争斗, 可采取下列措施。在每个栏内绑一个饲料袋, 让仔猪啃咬玩耍, 分散注意力; 喷洒有气味的液体(如含氯消毒剂), 使猪只嗅觉敏感性降低而不能识别非同群(窝)猪只; 有条件的猪场可增置一些福利性的玩具, 如塑料瓶、铁链、废轮胎等。



**3.3 进猪后头三天管理** 进猪后头三天必须进行精心护理,减少猪只因转群产生的应激,注意保温和通风的平衡,注意观察不吃料甚至不喝水和病、弱的仔猪,帮助仔猪度过艰难的并群转群关。普遍的做法为:进猪前一小时,让饮水器长流水,便于仔猪辨认喝水;增添玩具,减少并群争斗;限喂饲料 20%~40%,少喂多添;根据猪群健康状况,在饮水或饲料添加药物预防或治疗。挑出需要特别照顾的仔猪,可参考下面的观察事项:(1) 鸣叫走动,不食料不喝水;(2) 肚子干瘪;(3) 目光无神或有泪斑,独处;(4) 皮毛粗乱、无光泽;(5) 眼窝深陷,身躯瘦小;(6) 跛行;(7) 皮肤发红,被同栏仔猪撕咬。把需要特别护理的仔猪放到护理栏,饲喂好一些的饲料,能够喂拌水料更好,给个别不采食仔猪灌料,针对不同病状注射相应的抗生素,同时可注射维生素 B、维生素 C,增强仔猪食欲和对疾病的抵抗力,气温较低时要做好保温措施。

**3.4 “三定位”调教** 猪具有定点排泄、采食和卧睡的生物特性,关键是要尽早调教,使之形成良好的习惯。这对网床饲养的保育猪群来说有一定的难度,但是也可以努力尝试。参考方法有:进猪前 1 h 让饮水器长流水,一方面让仔猪辨认喝水位置,另一方面诱惑仔猪在此附近排尿排粪;把保温板(垫子)放置料槽前且靠近走道之处,如果保温板无缝隙可尝试撒少量饲料在上面,可起诱食和防止仔猪在附近排泄的作用;刚进猪几天喂料时,把少量饲料撒到料槽前垫板上;一旦发现仔猪乱排粪尿现象就要马上喝斥。

**3.5 饲养管理** 为了充分发掘保育猪的生长发育的遗传潜力,最好自由采食,但是考虑猪只此时胃肠容量小和消化能力尚未发育完善,再加上断奶应激,所以保育舍进猪刚开始 2~3 天应适当限料,少量多餐,保持在产房时的饲料种类和饲喂规律不变,一周内逐渐恢复正常的饲喂量,此后由分餐喂逐渐过渡到自由采食。注意一到两天使食槽清空 1~2 h,使仔猪保持旺盛食欲,又可防止仔猪过食拉稀。如果出现仔猪采食过多消化不良而拉稀,可以适当控料使其肠胃清空便可恢复正常。转料一定要遵循逐渐替换过渡的方法,例如按照 1/4,2/4,3/4,4/4 比例各饲喂 2 天,也可按照 1/6,2/5,3/4,4/3,5/2,6/1,7/0 的比例各饲喂 1 天。总之,一周内完成过渡,不能随意更换,另外,体重大的仔猪先换,体重小的仔猪后换,千万不能一刀切。此外,喂

料还要注意定量定时,不能忽多忽少,或随意更改饲喂时间,使仔猪形成良好的条件反射,促进食欲和消化。日常投料或巡视猪群时注意观察仔猪抢食情况和料槽剩料情况,以便准确把握投料量。

## 4 保健与免疫

药物保健方案具体要根据猪群的生理阶段和健康状态以及本场疾病发生的规律进行调整。一般来说,可在进猪后 2~3 天饮水添加多维等减少应激,之后可添加阿莫西林饮水(掌握好投药量,防止过量引起腹泻)。在主要流行疾病发生前可注射广谱抗生素提前预防,有条件的猪场经常做药敏试验以筛选合适的抗生素。60 日龄左右健胃驱虫。合理安排仔猪的疫苗注射,注射活菌苗前后数天内避免使用抗生素,错开注射病毒性活疫苗的时间,避开应激阶段例如转群前后免疫。

## 5 冲洗消毒

保育阶段冲洗尽量避免喷淋到仔猪身上,给猪身喷淋消毒弊大于利。断奶仔猪刚转进保育舍的头一周减少冲栏消毒次数,特别是天气寒冷和潮湿或者正在发生腹泻疾病的时候。在此情况下冲洗消毒应该选择在早上 10~12 时,使水分在白天能够完全挥发,避免仔猪受潮受冷引起强应激;天气炎热时候一周冲洗消毒 3~4 次,减少细菌病毒的侵袭和舍内氨气、硫化氢等有害气体的刺激。

## 6 巡视猪群

猪群的巡视工作是一项非常重要的工作,而且把它列为上班后必须做的第一份工作。当然日常喂料、冲洗和免疫时也需要留意猪群的健康状况。具体观察的内容有:(1) 舍温和空气质量:重点是依据温度计、猪群卧躺情况和人体感受来判断,这才是最接近仔猪的真实感受。(2) 水和料的食用情况:供水系统是否畅通?料槽饲料剩余多寡?是否发霉变质?仔猪食欲是否旺盛?(3) 挑出发病、病残和弱小的猪只,放到护理栏隔离照料或无公害处死等。(4) 评估每栏猪群的健康状况,计划将要采取的措施。(5) 有没有传染病发生?如果有就必须封锁现场,不能随意进栏和出舍,限制人员、工具等流动,防止疫情扩散,并立即上报主管部门。

## 7 做好日常工作纪录

按照规定填写各种报表,如药物领取使用情况,猪群疾病、治疗及死亡登记,饲料使用情况等,必须做到及时、准确。

# 珍禽——孔雀的饲养前景广阔

毕小艳, 张 彬

(湖南农业大学动物科技学院, 湖南 长沙 410128)

中图分类号: S816

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0018-02

孔雀古称孔雀、孔鸟, 俗称凤凰、越鸟、南客等。在动物学分类地位上属于鸟纲(*Aves*), 鸡形目(*Galliformes*), 雉鸡科(*Phasianid*), 孔雀属(*Pavo*)。有绿孔雀(*Pavo muticus*)和蓝孔雀(*Pavo cristatus*)之分, 绿孔雀即中国孔雀又称爪哇孔雀, 后者又称印度孔雀。此外还有蓝孔雀的两种突变形态白孔雀和黑孔雀<sup>[1-3]</sup>。绿孔雀原产于我国西部, 分布在云南省西南部的西双版纳地区, 此外, 它还分布在越南、泰国和印度。绿孔雀为国家一级保护动物, 严禁捕杀。蓝孔雀为国家二级保护动物, 珍稀半草食性非保护动物, 可人工饲养, 它不是我国原产动物, 但近十多年却在我国得到了迅速的发展, 并已成为一个相当庞大的养殖行业<sup>[1]</sup>。人工饲养的蓝孔雀及其杂交种可供食用。如江苏省沛县风怡达珍禽场用绿孔雀和蓝孔雀杂交育成的一种肉用孔雀, 体重比普通蓝孔雀多 1~1.5 kg<sup>[4]</sup>。

## 1 孔雀的生物学特点

孔雀具有易饲养、好管理、少生病、适应性广、生长繁殖期长等特点。蓝孔雀原生活在亚热带, 栖于海拔 2 000 m 以下的广阔草原地带, 多是一雄多雌活动。双翼不发达, 不善飞行, 很喜欢在栖架上栖息。觅食一般在清晨和黄昏, 清晨来到溪边喝水边清洗羽毛, 然后一起去树林中觅食, 炎热的正午则在荫凉的林中休息, 黄昏再次采食。晚间则飞上树枝休息。野生状态下, 孔雀一般是以 1 只公孔雀为中心组成一个小群体, 其中还包括 3~5 只母孔雀, 有时还带着幼孔雀。孔雀属于杂食性鸟类, 食物包括梨、黄泡等果实, 也吃糟谷、芽苗、草籽等, 还食用一些昆虫和小型爬行动物。孔雀的动物性食物以白蚁为主。孔雀开屏为繁殖期内公孔雀所特有的一种繁殖生理现象。幼孔雀体成熟较早, 性成熟较迟, 2 周岁时开始繁殖产蛋。人工饲养条件下, 采用增加光照时间的方法可使孔雀的性成熟提前到 15 月龄, 开产时体重接近或等于成年体重, 为 6 kg 左

右。人工饲养时群体中公母比以 1:4 为宜<sup>[5]</sup>。

孔雀的寿命一般是 20~25 年。成年孔雀每年 8~10 月份换羽, 10 月后大部分孔雀羽毛已换羽齐全, 雄孔雀尾屏因年龄体质不同, 一般要到 12 月份才能长齐。孔雀的天敌主要是猫、豹等食肉动物<sup>[1]</sup>。

## 2 孔雀产品市场前景看好

### 2.1 孔雀的观赏价值

孔雀属于吉祥高贵的观赏鸟, 因其羽毛艳丽, 色彩斑斓, 具有极高的观赏价值而被各地广泛引进和饲养<sup>[6]</sup>。蓝孔雀和绿孔雀颇为相似, 它们的主要区别是羽冠不同。绿孔雀的羽冠为柱状, 聚起成撮, 体型较大, 头颈部羽毛为绿色; 蓝孔雀的头颈部羽冠展开可成扇形状, 体型较小, 头颈部羽毛成宝蓝色。

蓝孔雀羽色艳丽夺目, 在全世界的各大公园中, 蓝孔雀主要作为观赏动物饲养。蓝孔雀的羽毛大有用场, 古人用它编织成扇或者漂亮的衣裳, 封建帝王还将它编织成伞盖。孔雀的羽很名贵, 商品名称为“孔雀翎”、“孔雀线”、“孔雀眼”, 适合做各种装饰品。人们也将孔雀羽置于室内, 用于装点房屋。至今民间还常取之装饰于帽上。

### 2.2 孔雀的食用价值

禽肉食品无疑是畜牧业中最成功的行业, 禽蛋业正在向新产品开发跨越<sup>[7]</sup>。孔雀全身是宝, 具有极高的食用、保健价值, 有“水牛老鳖, 禽中孔雀”之说。孔雀肉质结实, 产肉多, 屠宰率达 80% 以上。肉质细嫩, 野味浓, 高蛋白、低热量、低脂肪、低胆固醇, 是高档的美味佳肴; 其蛋白质含量高达 23.2%, 远高于一般禽类。热量为 101 kcal/100 g。脂肪含量仅为 0.8%, 只是鸡的 1/10, 胆固醇低于 50 mg/g, 远远低于一般禽类和鸡蛋。高于蛇、甲鱼、龙虾和石斑鱼, 富含 10 多种氨基酸、维生素和微量元素<sup>[8]</sup>。与家禽、家畜相比, 孔雀肉的水分含量(73%)与鸡肉(73%~75%)、猪肉(70%)和牛肉(75%)相当, 蛋白质含量高于牛肉(18%~22%), 其脂肪、热量和胆固醇含量(0.8%、101

kcal/100g, 50 mg/g) 都低于鸡肉、猪肉和牛肉<sup>[9]</sup>。孔雀是百鸟之王，过去只在动物园里看到。随着市场经济的发展，它已经变成了商品，是特禽新品种的代表，已成为招待贵宾的美味佳肴，早已远销国外<sup>[5,10]</sup>。过去孔雀作为最高级及稀罕的食品只有帝王将相、土族首领才能有资格享用。在全盛时期的英国也只有王室才有较详细的孔雀菜谱。烤孔雀或者在特殊的盛会上可提供，但只有在一个人被授予以爵士地位庆祝会上或者由贵族或国王举办的庆祝会上，才有机会享用<sup>[11]</sup>。随着孔雀规模饲养的成功，越来越多的人可享用孔雀肉的滋味，并深受广大食客的赞赏。孔雀还是开发保健食品的好原料。

**2.3 孔雀的药物价值** 孔雀不但营养价值高，肉味鲜美，而且也是很好的医药原料。孔雀在医药上的用途，早在明朝李时珍的《本草纲目》就有详细说明。药圣李时珍对孔雀评价奇高，《本草纲目》记载“孔雀辟恶，能解大毒、百毒及药毒，其胆也可作药”。孔雀肉、血有解毒的功效，主治药毒、蛊毒；粪便亦有解毒利水的功效，主治妇女带下，小便不利，恶疮等<sup>[12]</sup>。

**2.4 孔雀的深加工前景** 除直接食用外，孔雀肉可加工成各种食品。羽毛、鲜艳的头颈、尾羽可制作高档的工艺品。其它部分可用于制作高级羽绒。血、肉可提炼有效成分制成解毒药。初级加工的冻孔雀肉进入寻常百姓家已不是天方夜谭的神话了，使人们既可享受到世上最味美的食品，又可在不知不觉中达到强身健体的功效。尿：提取有效成分制成美容品、药膏等。美容品既促进血液循环增加表皮细胞的新陈代谢能力，又有抑杀细菌之功能。孔雀标本在国际市场上久享盛名，非常抢手，每架出口价为1万多元，国内市场行情也达6 000~8 000元，所以人工养殖孔雀是前景广阔的好项目<sup>[13]</sup>。

### 3 饲养孔雀的经济效益分析

孔雀一般22个月性成熟，产蛋期集中在4~6月份，第二年开始产蛋，产蛋量逐年增加，一般为20~50枚，多的达70枚以上，蛋重120~140g，产蛋期10年以上，寿命一般在20年以上<sup>[14]</sup>。一般出壳饲养6个月，体重达3.5kg左右即可上市，成年孔雀在4~5kg以上。目前商品蓝孔雀在全国各大城市的零售价超过100元/kg，是家鸡的10倍。如饲养一组（10母2公），年繁殖商品孔雀约200只以上，每只按4kg计算，按商品价60元/kg，每只收入240元，除去成本40元/只，可盈利200元

/只，养一组孔雀一年即可轻松获利4万元。

### 4 疾病防治

疾病必须以预防为主。孔雀易患球虫病和白痢病<sup>[15,16]</sup>。平时饲养管理中必须加强清洁卫生工作。孔雀每次入栏前，必须对栏舍及用具进行消毒<sup>[17]</sup>。每季度进行1次驱虫。7日龄进行新城疫Ⅱ系疫苗滴眼，30日龄、60日龄分别进行新城疫Ⅰ系疫苗肌注。每年开产前进行1次新城疫灭活疫苗肌注<sup>[18]</sup>。

### 5 结束语

孔雀这种新型健康特禽因具有较高的食用、药用、观赏价值及深加工前景，正以不可抵挡之势走向市场，价格也不断提高。饲养孔雀的经济效益和社会效益前景诱人，是一项有“钱图”的养殖项目。

### 参考文献：

- [1] 张健, 丁伯良. 特种经济动物新品种—蓝孔雀(上)[J]. 农村养殖技术, 2001, (9): 19-20.
- [2] 刘马根. 孔雀的饲养与繁殖[J]. 特种家禽, 1995, (1): 340.
- [3] 吴君. 绿孔雀饲养与繁殖状况的调查与分析[J]. 黑龙江动物繁殖, 2004, 13(2): 46-47.
- [4] 赵从民. 肉用孔雀的发展前景及养殖技术[J]. 中国牧业通讯, 1999, (4): 19.
- [5] 陈秋实, 张代涛. 孔雀的饲养管理技术[J]. 中国农村小康科技, 2002, (12): 29.
- [6] 张洪文. 浅谈蓝孔雀养殖[J]. 特种经济动植物, 2006, (1): 13.
- [7] S Leeson. Predictions for Commercial Poultry Nutrition [J]. Appl. Poult. Res, 2008, (17): 315-322.
- [8] 丁小良, 葛惠元, 王建良, 等. 蓝孔雀的经济学特性及高效饲养模式[J]. 上海农业科技, 2005, (2): 76.
- [9] Bonjour J P, M A Sclurch, et al. Protein intake, IGF1 and osteoporosis[J]. Osteoporos Int, 1997, 7(3): 36-42.
- [10] 李涛. 肉用孔雀的养殖[J]. 河南科技, 2001, (9): 36.
- [11] 林灼辉, 方小文, 黄胜平. 孔雀的开发前景[J]. 养禽与禽病防治, 1994, (4): 39.
- [12] 李建东, 李成建, 廖波, 等. 蓝孔雀的饲养管理[J]. 广东畜牧兽医科技, 2002, 25(4): 14.
- [13] 郭文华. 孔雀的人工养殖技术[J]. 中国农村小康科技, 1999, (11): 26-27.
- [14] 沈宪文. 孔雀的人工养殖方法[J]. 特种经济动植物. 2007, (12): 16-17.
- [15] 黎丽华. 蓝孔雀养殖新技术[J]. 特种养殖. 2005, 35(6): 36-37.
- [16] G White, RB Williams. Evaluation of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline for the treatment of bacterial and coccidial diseases of poultry [J]. Research in veterinary science, 1983, (113): 608-612.
- [17] 沈瑞. 蓝孔雀分期饲养好[J]. 河南畜牧兽医, 2008, 29(11): 46.
- [18] 杨秀环, 李秀敏, 郑瑞峰, 等. 孔雀新城疫病的诊断与控制[J]. 当代畜牧. 2003, (2): 11.

# 广东省部分猪场副猪嗜血杆菌的分离与鉴定

姚晓辉<sup>1</sup>, 陈芳艳<sup>3</sup>, 陈瑞爱<sup>1</sup>, 唐秀英<sup>1</sup>, 区德庆<sup>1</sup>, 吴诗敏<sup>2</sup>, 王林川<sup>1,2</sup>

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 新兴 527400; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3. 华南农业大学动物科技学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 从广东部分猪场发病猪的肺脏、气管和扁桃体分离细菌并培养, 获得3株可疑菌株。根据发病猪的临床症状、剖检病理变化以及菌落的形态、菌体特征和生化试验结果, 初步鉴定所分离的3株菌株为副猪嗜血杆菌。在细菌学鉴定的基础上, 同时结合特异性PCR检测方法进行鉴定, 结果3株菌株均扩增出822 bp的特异性目的条带, 进一步证实了所分离的3株菌株均为副猪嗜血杆菌。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 分离; 鉴定

**中图分类号:** S852.61<sup>2</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0020-02

副猪嗜血杆菌病是由副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)引起猪的一种以多发性浆膜炎、关节炎及高死亡率为特征, 严重危害仔猪和生长猪的传染性疾病。副猪嗜血杆菌作为猪呼吸道综合症(Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC)主要的继发细菌性病原, 近年来引起的发病率越来越高, 特别是在猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)和猪圆环病毒2型(PCV-2)感染后, 几乎总是伴随着HPS的感染<sup>[1]</sup>。HPS主要感染断奶后和保育舍的仔猪, 通常见于5-8周龄的猪, 发病率一般为10%~15%, 严重时死亡率可达50%。HPS引起的猪呼吸道疾病的临床症状与其他细菌感染很相似, 易混淆, 要确诊还必须进行细菌的分离和鉴定。在对广东猪场进行HPS进行调查的, 分离到了3株疑似菌株, 进行了常规的分离鉴定和PCR检测, 现报道如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 病料的来源** 广东省珠海、河源、云浮地区的养猪场送检仔猪和病料。

**1.1.2 副猪嗜血杆菌血清型4标准菌株** 华南农业大学兽医学院兽医传染病教研室保存。

**1.1.3 培养基** TSA培养基(含小牛血清和NAD), 普通琼脂培养基, 麦康凯培养基, TSB营养肉汤, TSB营养肉汤(含小牛血清和NAD), 微量生化鉴定管, Ex Taq DNA聚合酶, dNTPs, DNA Marker DL2000, 琼脂糖, PMD18-T Vector, 大肠杆菌DH5α感受态细胞, DNA凝胶回收试剂盒等, 多为进口试剂。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 细菌的分离** 含小牛血清和NAD的TSA培养基的制备: 称取4克TSA培养基加入100 mL蒸馏水中, 121℃高压灭菌20 min, 待温度降至55℃左右时(以手背不感到烫为适), 加入NAD(经0.22 μm的细菌滤器过滤), 使NAD的终浓度为200 μg/mL, 然后加入小牛血清, 使血清浓度达到5%, 倒平板, 每板大约10 mL。

在无菌操作条件下, 从疑似病猪的鼻腔、气管、肺脏、心脏、心包积液、关节液、脾脏等病料中取样, 在TSA培养基上划线接种, 37℃培养48 h, 挑取可疑单个菌落进行纯培养。纯培养后的细菌, 涂片后革兰氏染色镜检。再将细菌接种普通肉汤培养基和麦康凯培养基, 37℃培养48 h, 将在TSA培养基上能生长、但在普通琼脂培养基和麦康凯培养基上不能生长的可疑细菌(5、10、14号细菌)接种TSB营养肉汤。

**1.2.2 细菌学鉴定** 微量生化管鉴定: 取上述接种TSB营养肉汤的5、10、14号细菌分别接种于葡萄糖(两管)、麦芽糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖、乳糖、靛基质、甘露醇、山梨醇、尿素酶、鸟氨酸、精氨酸、硝酸盐还原反应等微量生化鉴定管, 微量生化鉴定管中同时加入5 μL NAD。鸟氨酸、精氨酸和其中的一管葡萄糖用石蜡封闭, 37℃培养过夜。

### 1.2.3 PCR方法鉴定

**1.2.3.1 引物的设计与合成** 根据Simone Oliveira等<sup>[2]</sup>报道合成引物。

上游引物: A1: 5' -GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3'

下游引物:A2:5' -GGCTTCGTCACCCTCTGT-3'

引物由上海生物工程技术有限公司合成,该引物扩增片段为编码 HPS 16S rRNA 的 DNA 部分片段,长度约为 822 bp。

**1.2.3.2 细菌 DNA 提取** 按 Redondo 等方法<sup>[3]</sup>,取对数生长期的 3 种菌悬浮于 10 mmol/L Tris 1 mmol/LEDTA 溶液中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用溶菌 Buffer 重悬,水浴 56℃ 作用 30 min,煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清,-20℃ 保存备用。

**1.2.3.3 PCR 反应** 反应体系为:10 ×PCR Buffer 2.5 μL;dNTPs 2 μL;MgCl<sub>2</sub> 2 μL;Ex Taq 酶 0.15 μL;模版 2 μL;ddH<sub>2</sub>O 14.35 μL,总反应体积 25 μL。反应程序为:94℃ 2 min,94℃ 30s, 59℃ 30s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,并用 EB 染色,紫外线投射观察。

**2 结果**

**2.1 HPS 的分离、细菌学鉴定结果** 在疑似病猪的肺脏和气管中分离到 3 株可疑菌株,分别命名为 LC 株、ZQ 株、YF 株。3 株菌株在镜下形态相似,均为革兰氏阴性短小杆菌,无芽孢。在麦康凯培养基和普通琼脂培养基上不生长;在含有血清和 NAD 的 TSA 生长良好,为针尖大小的透明或半透明的菌落,边缘整齐、光滑、圆形隆起,相对而言较其他的 HPS 生长缓慢。LC 株、ZQ 株、YF 株的生化试验结果见表 1,其结果符合副猪嗜血杆菌生化特性<sup>[4,5]</sup>。

表 1 LC、ZQ、YF 菌株的生化试验结果

菌株	LC	ZQ	YF
葡萄糖	+	+	+
葡萄糖(封口)	+	+	+
麦芽糖	+	+	+
果糖	+	+	+
木糖	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+
蔗糖	+	+	+
乳糖	+	+	-
靛基质	-	-	-
甘露醇	-	-	-
山梨醇	-	-	-
尿素酶	+	+	+
鸟氨酸	-	-	-
精氨酸	-	-	-
硝酸盐	+	+	+

1): “+” 阳性;“-” 阴性

**2.2 PCR 鉴定结果** 可疑菌株 LC 株、ZQ 株、YF 株均能扩增出与预期片段大小一致约 822 bp 的特异性目的条带,可断定菌株 LC 株、ZQ 株、YF 株都为副猪嗜血杆菌。结果见图 1。

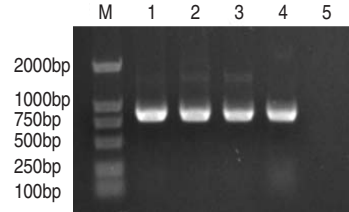


图 1 3 株分离菌株 PCR 扩增结果

M. DNA marker DL2000; 1. 阳性对照菌; 2. LC 株; 3. ZQ 株; 4. YF 株; 5. 阴性对照

**3 讨论**

HPS 是猪上呼吸道的一种常在菌,在正常猪或患病猪上呼吸道都可能分离到该菌。HPS 的分离培养常受到抗生素或化学治疗剂的影响,因此患病活猪送检后,要想取得理想的分离结果,不能立即剖检分离,间隔 3~5 天的休药期后再对其剖检分离。另外,若猪只死亡时间超过 12 h,分离到该细菌的机率就很小<sup>[6]</sup>。HPS 对培养基的要求很严格,经本试验研究发现,如果培养基中加入的 V 因子的含量较少,分离到 HPS 的几率比较小,而且也容易死亡。另外,HPS 的分离培养困难,生化鉴定复杂,临床病料研磨后直接进行 PCR 检测,可以对该菌进行快速鉴定。

**参考文献:**

[1] 林雪玲,黄耿森,洗琼珍,等.副猪嗜血杆菌的分离鉴定与 PCR 检测方法的建立及应用[J].吉林农业大学学报[J],2006,28(3):321-324.

[2] Oliveira S,Galina L,Pi Joan C.Development of a PCR test to diagnose Haemophilus parasuis infections[J]. J Vet Diagn Invest,2001,13(6):495-501.

[3] De la Puente Redondo VA,Navas Mendez J,Garcia del Blanco N,et al.Typing of Haemophilus parasuis strains by PCR-RELP analysis of the *tbpA* gene[J]. Vet Microbiol,2003,92,(3):253-262.

[4] 冬秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.120-126.

[5] Kielstein P,Wuthe H,Angen O,et al.Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance[J].Vet Microbiol,2001,81(3):243-255.

[6] 尹秀凤,姜平,邓雨修.副猪嗜血杆菌的分离与鉴定[J].畜牧与兽医,2004,36(7):5-7.

# 新疆石河子地区隐形乳房炎病原菌的分离鉴定和药敏试验

刘东军

(新疆石河子 148 团农业科, 新疆 石河子 832048)

**摘要:** 为了解石河子地区奶牛场隐性乳房炎流行情况及其主要病原菌, 采用 LMT 方法检出隐性乳房炎乳样后, 对部分阳性乳样进行细菌分离与鉴定, 同时对其主要病原菌进行了药敏试验。结果表明, 奶牛场隐性乳房炎的感染率为 56.3%; 对 307 头共 378 份阳性奶样进行了病原菌的分离鉴定, 结果发现, 阳性乳样品中细菌分离率达 62.7% (237/378), 葡萄球菌、链球菌、肠杆菌和棒状杆菌为主要致病菌, 且多为几种致病菌的混合感染。其敏感的抗菌药物有头孢唑酮钠、头孢噻肟钠、氧氟沙星、克林霉素等。

**关键词:** 隐性乳房炎; 致病菌分离鉴定; 药敏试验

**中图分类号:** S857.2'6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0022-02

奶牛乳房炎是奶牛生产中最常见的三大炎症之一, 它给奶牛业造成巨大的经济损失。尤其是奶牛隐性乳房炎(又称亚临床乳房炎)病因复杂, 隐蔽性强, 更是一个亟待解决的难题。据报道, 美国、日本的奶牛隐性乳房炎发病率为 62.1%, 而我国为 50%~80%, 高于世界发达国家的平均水平。2006 年 3 月至 2008 年 11 月笔者对石河子地区 5 个集约化奶牛场 545 头奶牛做隐形乳房炎检测, 对隐形乳房炎阳性奶样 378 份进行病原分离鉴定, 并在流行病学调查基础上, 分析鉴定石河子地区优势致病菌的种类, 通过药敏试验为寻求最佳的治疗方案提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验用动物** 被检泌乳期奶牛 545 头, 来自新疆石河子地区 5 个规模化奶牛场。

**1.2 仪器、试剂及培养基** 兰州奶牛乳房炎检测试剂(LMT), 批号 20060325, 市场购买。生化鉴定用微量发酵管, 购自杭州天和微生物试剂有限公司。葡萄球菌生化微量鉴定管(凝固酶、硝酸盐还原、麦芽糖、蕈糖、甘露糖、木糖、蔗糖、核糖、乳糖、果糖、甘露醇、木糖醇、尿素酶); 链球菌生化鉴定管(血清菊糖、甘露醇、乳糖、棉子糖、葡萄糖、水杨素、蕈糖、淀粉、明胶、七叶苷、65 g/L 高盐肉汤、美蓝牛奶、马尿酸盐、pH 9.6 肉汤); 肠杆菌生化微量鉴定管(分解葡萄糖产气、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、靛基质、甲基红、枸橼酸盐、硫化氢、尿素、运动力)。鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂、普通营养琼脂、厌气肝汤生化培养基及试剂按常规方法配制。

**1.3 隐性乳房炎的检测及乳样采集** 用温水清洗

乳房, 1:400 百菌消-30 消毒乳房, 用 70% 的酒精溶液消毒乳头。戴灭菌手套进行人工挤乳, 弃去前三把乳汁, 分别将 4 个乳区 2 mL 左右的乳汁挤入相应的乳汁检验盘中, 倾斜加入 1:3 稀释的 LMT 试剂 2 mL, 水平晃动, 使乳汁与检测试剂充分混合, 10 秒后观察并判定结果。阴性(0~20 万个体细胞数)混合物呈液状, 盘底无沉淀物; 可疑(15 万~50 万个体细胞数)混合物呈液状, 少量絮状物, 摇动后消失; 弱阳性(40 万~100 万个体细胞数)有明显絮状物或沉淀产生; 阳性(80 万~400 万个体细胞数)絮状物或沉淀黏稠不易流动; 强阳性(350 万个以上体细胞数)混合物几乎完全形成胶状不能流动。

选取 LMT 检测阳性的牛只, 无菌采集每个乳头的奶样品 10 mL, 置无菌青霉素瓶中, 加盖, 标明牛耳号、乳室、日期。经 LMT 普查、筛选, 共采集隐性乳房炎阳性乳样品 378 份, 供实验室细菌分离与鉴定。

**1.4 乳样品的细菌分离** 无菌将每份乳样品分成 2 小份, 分别做需氧菌和厌氧菌的分离培养。

**1.4.1 厌氧菌的分离培养** 将乳样分别接种于厌气肝汤培养基, 置恒温箱, 37℃ 增菌培养 16~24 h 后, 观察细菌在肉汤中的生长情况, 进行初步的涂片、染色、镜检, 并做好记录。将初次厌氧培养物再划线接种于鲜血琼脂培养基上, 置于厌氧罐中培养 24~48 h。

**1.4.2 需氧培养** 用无菌小棉签将牛奶分别接种鲜血琼脂培养基、麦康凯琼脂培养基和普通琼脂培养基, 并做好标记, 置恒温箱培养 16~24 h, 挑选单菌落做纯化培养, 并涂片进行革兰氏染色, 镜检。

**1.5 细菌鉴定** 根据细菌培养特性、染色形态特征,将分离菌初步分为G<sup>+</sup>球菌、G<sup>-</sup>球菌、G<sup>+</sup>杆菌、G<sup>-</sup>杆菌四类,确定其生化反应和其他鉴定项目。

**1.5.1 G<sup>+</sup>球菌** 接触酶试验阳性者,应用葡萄球菌生化微量鉴定管进行鉴定;接触酶试验阴性者,做链球菌生化鉴定。

**1.5.2 G<sup>+</sup>杆菌** 镜检观察,菌体分支的可初步定性为诺卡氏菌属,菌体不分支的为棒状杆菌,并可进一步做接触酶等生化试验给予定性。

**1.5.3 G<sup>-</sup>杆菌** 乳糖试验阳性者,应用肠杆菌生化微量鉴定管进行鉴定;乳糖试验阴性者,可根据菌落生长情况和MR试验阴性者确定为绿脓杆菌,阳性者可能为变形杆菌,归于肠杆菌。

**1.6 主要病原菌的药敏试验** 采用药敏纸片琼脂扩散法对主要病原菌进行药物敏感性试验,即将分离鉴定的主要病原菌分别均匀涂布于鲜血琼脂平板上,然后贴药敏纸片于其上,置37℃培养24~48 h,测量抑菌圈直径,进行抑菌效果判定。

## 2 结果

**2.1 流行病学调查结果** 在被检的545头无临床症状的泌乳牛中,检出隐性乳房炎牛307头,占56.3%,乳区378个。其中一个乳区阳性的有255头,占总数的83.06%;2个乳区阳性的有37头,占总数的12.05%;3个乳区阳性的有11头,占总数的3.58%;4个乳区阳性的有4头,占总数的1.3%。

**2.2 隐形乳房炎患病乳区分布** 在一个乳区患隐形乳房炎的255个病例中有203头为后乳区感染,占总发病数的79.6%,其中右侧后乳区为139头,占后乳区发病数的68.4%。左侧后乳区为64头,占后侧乳区发病的数的31.6%。前乳区感染的病例有52头,占发病总数的20.4%。其中右侧后乳区为36头,占后乳区发病数的69.23%;左侧后乳区为16头,占后侧乳区发病的数的30.77%。

**2.3 细菌分离鉴定结果** 分离到致病菌的有237份,占患隐形乳房炎乳区数的62.2%。随机选取40份细菌做分离鉴定。从乳样品中检出56个菌株,主要病原菌是金黄色葡萄球菌21株,占37.57%;无乳链球菌13株,占23.2%;大肠埃希菌10株,占17.86%;乳房链球菌3株,占5.36%;沙门氏菌、化脓棒状杆菌、停乳链球菌、志贺菌均为2株,各占3.57%;牛棒状杆菌1株,占1.78%。

**2.4 药敏试验结果** 采用药敏纸片琼脂扩散法对

主要病原菌进行药物敏感性试验,分析金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌主要病原球菌对11种不同抗生素的敏感性(测量其抑菌圈直径)。结果显示,氧氟沙星、环丙沙星、头孢派酮钠、头孢唑啉钠、克林霉素对金黄色葡萄球菌的抑菌效果较好;头孢派酮钠、头孢唑啉钠、氟苯尼考、克林霉素、白霉素对无乳链球菌的抑菌效果较好;氧氟沙星、阿奇霉素、头孢派酮钠、克林霉素对大肠杆菌的抑菌效果较好。

## 3 讨论

**3.1 奶牛乳房炎是乳腺受到物理、化学、微生物等因素的刺激所发生的一种炎症变化,病原微生物是引起奶牛乳房炎的主要原因。已经报道的奶牛乳房炎病原微生物有150多种,包括细菌、真菌、病毒、支原体等。研究表明,引发奶牛乳房炎的病原主要为金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠埃希菌,由这3种病原菌引起的奶牛乳房炎约占该病发病总数的90%以上。单纯由某一个病原菌引起的奶牛隐性乳房炎较少,而多数是由2种、3种甚至3种以上的病原菌引起的。**

**3.2 石河子地区冬季天气寒冷,奶牛圈舍潮湿阴冷,加上饲料、饮水匮乏等问题,导致奶牛的抵抗力下降,使大量的条件性致病菌有机可乘,从而引起奶牛隐性乳房炎的暴发流行。隐性乳房炎感染率的高低与饲养管理、环境卫生条件、病原菌致病力强弱等因素均有直接的关系。因此,加强奶牛饲养管理,保持环境卫生清洁,消除环境因素影响,提高奶牛免疫力,可以预防和控制奶牛隐性乳房炎的发生与流行。**

**3.3 加强干奶期奶牛的饲养管理以及奶牛乳房炎的预防及治疗也很重要。有资料显示,干奶期治疗奶牛乳房炎不但能治愈现有疾病,也能预防新的感染,还有治愈率比泌乳期高、能够较长时间使用高浓度抗生素、不存在乳汁中药物残留等优点。**

**3.4 预防和控制奶牛隐性乳房炎,目前仍以抗生素为主。从本次药敏试验结果来看,头孢哌酮钠、头孢唑啉钠、氧氟沙星、克林霉素、氟苯尼考、阿奇霉素等药物对隐性乳房炎主要致病菌具有良好的抑菌效果,常用的抗生素如青霉素类、链霉素、庆大霉素等已存在抗药性。但头孢类和喹诺酮类抗生素治疗奶牛隐性乳房炎价格昂贵,常给奶牛养殖场带来沉重的经济负担。因此,探索既经济又有效的奶牛隐性乳房炎治疗方法迫在眉睫。**

# 一例鸡球虫病的诊断报告

魏昆鹏<sup>1</sup>, 郭万华<sup>1</sup>, 陈灿菊<sup>2</sup>, 崔艳辉<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北任丘畜牧水产局, 河北 任丘 062550)

**摘要:** 鸡球虫病是一种危害极大的世界性分布的寄生性原虫病, 其中以柔嫩艾美耳球虫对鸡的致病性最强。其特征性症状和大体病变为: 血便, 盲肠肿大、出血; 病原学检查可见虫卵。经临床症状观察、病理学与病原学检查等方法可对该病进行确诊。

**关键词:** 鸡球虫病; 诊断

**中图分类号:** S855.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0024-02

鸡球虫病是由寄生于鸡肠道上皮细胞内的原生虫引起的寄生虫病<sup>[1]</sup>, 是养禽业中最主要的疾病之一, 也是养禽业中造成损失较大的疾病之一。2008年河北省井陘县某鸡场饲养的雏鸡发生本病, 现将诊断与治疗过程报告如下。

## 1 发病情况

河北省井陘县某鸡场饲养雏鸡 10 000 只, 2008年 4 月 24 日龄雏鸡出现便血, 治疗前大批死亡, 3 日内死亡 1 200 只。经流行病学调查发现, 鸡舍通风换气不良, 阴暗潮湿, 地面上粪便成堆, 构成了球虫病流行的诱因。

## 2 临床症状

病初雏鸡精神沉郁, 羽毛蓬松, 缩颈呆立一旁, 食欲减退, 泄殖腔周围的羽毛被稀粪沾污。随着病情进一步发展, 病鸡表现共济失调, 翅膀轻瘫, 渴欲增加, 食欲废绝, 嗉囊内充满液体, 鸡冠和可视粘膜苍白, 逐渐消瘦, 粪便呈水样, 并带有少量血液。部分鸡开始时粪便为咖啡色, 以后完全变为血粪。末期发生痉挛和昏迷, 不久死亡。

## 3 剖检变化

两侧盲肠出血, 显著肿大, 为正常的 2~3 倍, 剖开后可见盲肠肠壁变厚, 严重糜烂, 其中充满凝固的或新鲜的暗红色血液。腺胃、十二指肠、肺和脾未见明显异常。

## 4 实验室检查

**4.1 病理组织学检查** 采集病雏鸡的心、肝、肾、肺、腺胃、十二指肠、盲肠, 置于 10% 中性福尔马林液中, 固定 24 h 后, 经系列浓度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片; 烤片后, 放入二甲苯中脱蜡, 再放入系列浓度酒精中脱二甲苯; 自来水洗后浸入苏木素(染细胞核), 经 1% 盐酸酒精风干后,

氨水促蓝, 最后经伊红染色<sup>[2]</sup>。风干后用含二甲苯的中性树胶封片, 光学显微镜下观察组织病理学变化。盲肠粘膜上皮广泛或局部性脱落, 粘膜下层水肿及出血, 固有层及粘膜下层淋巴细胞和浆细胞大量增生, 肌层内也有同样的细胞浸润。盲肠起始端粘膜固有层和粘膜下层淋巴细胞增生, 淋巴滤泡明显。心、肝、肾的实质细胞呈现轻度的颗粒变性或水泡变性。腺胃、十二指肠、肺和脾未见明显异常。在上皮细胞内或肠腔中可观察到裂殖子(图 1), 小配子(图 2), 大配子(图 3) 和卵囊(图 4)。

**4.2 病原学检查** 采用饱和食盐水漂浮法<sup>[3]</sup>: 取新鲜的病鸡粪 5g 放入 50 mL 烧杯内, 再加入 40 mL 饱和食盐水搅匀, 通过铁丝筛过滤到另一个 50 mL 的烧杯中, 添加饱和食盐水到满杯, 静置 40 min。取表层液体置载玻片上, 加盖片后镜检。显微镜下可观察到一端稍尖, 另一端钝圆, 呈卵圆形或椭圆形的卵囊。盲肠粘膜刮取物镜检, 亦发现大量卵囊。

**4.3 诊断结果** 根据临床症状、病理剖检、病理组织学检查、病原学检查等结果综合诊断该场雏鸡发生了由柔嫩艾美耳球虫引起的球虫病。

## 5 预防与治疗

**5.1 预防** 对没有发生球虫病的鸡群进行紧急预防。氯苯胍 30~33 mg/kg 混饲, 连续使用 1 周。

**5.2 治疗** 对已感染鸡群采用磺胺喹噁啉 500~1 000 mg/kg 与氨丙啉 100~125 mg/kg 混饲。

**5.3 效果** 经采取上述治疗措施, 从第 3 天开始死亡数量减少, 临床症状减轻, 鸡群精神、食欲以及粪便逐渐正常, 第 5 天死亡停止, 鸡群恢复正常。

## 6 讨论

**6.1 鉴别诊断** 由于几种疾病的病理变化与球虫病相似, 因此应注意鉴别诊断: 组织滴虫在引起盲



肠病变的同时肝脏呈紫褐色, 有火山口样病变, 而柔嫩艾美耳球虫仅见盲肠病变; 坏死性肠炎肠道粘膜呈坏死性变化, 外观肠浆膜有不规则的出血, 肠壁不增厚; 食盐和药物摄入量过多引发的鸡只间歇性腹泻, 病鸡肠管粘膜面紧贴在一起, 不充盈<sup>[4]</sup>。

**6.2 加强饲养管理** 经常清除畜舍及运动场内的粪便, 清除后再用 5% 石炭酸或 10% 克辽林喷洒畜舍和运动场; 粪便要堆积发酵处理, 以杀灭球虫卵囊; 雏鸡和成年鸡要隔开饲养; 饲料要全价, 以满足鸡只对维生素 K 和维生素 A 的需要, 维生素 K 可大幅度降低柔嫩艾美耳球虫病的死亡率, 维生素 A 可促进球虫病爆发后的康复。

**6.3 药物防治** 选择敏感的抗球虫药物: 不同的药物对同一种球虫作用效果不同, 不同种的球虫对同一种药物敏感性不同。选择药物时, 首先要根据临床症状、剖检变化和球虫的寄生部位判定球虫的种类<sup>[5]</sup>, 如柔嫩艾美耳球虫对氨丙琳敏感, 莫能菌素对毒害艾美耳球虫作用强大; 其次是了解抗球虫药物的活性高峰期, 针对性选择药物, 活性高峰期在 1~3 d 的多作预防用药, 如氯苯胍、氨丙琳等; 活性高峰期在 3 d 以上的多作治疗用药, 如球痢灵、磺胺类等<sup>[6]</sup>。

**6.4 疫苗应用** 大量的研究试验<sup>[7~9]</sup>及生产实践

都已证明, 鸡只重复感染球虫 2~3 次后, 即可产生坚强的抗球虫免疫力, 从而使鸡只免受球虫的侵害。因此, 通过疫苗免疫预防球虫病是安全可行的。

#### 参考文献:

- [1] 赵正兴. 鸡球虫病的病情调查及综合防治[J]. 四川畜牧兽医, 2005, (5): 51-52.
- [2] 天欣天, 董文德, 邱震东. 家禽尸体剖检术式[M]. 现代动物病理学实验技术, 1992.
- [3] 王宗仪. 蠕虫学粪便检查法[M]. 畜禽寄生虫学与寄生虫病学实验指导, 2000.
- [4] 曹广兵, 袁迎春, 班成. 鸡球虫病的危害及防治[J]. 畜禽业, 2003, (5): 50-51.
- [5] 陈志华, 陈晓生. 鸡球虫病的药物防治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, (2): 41-42.
- [6] 缪德年, 樊生超, 录慧娟. 鸡球虫病防治策略[J]. 中国禽业导刊, 1998, 14(2): 48-49.
- [7] 孙华, 庄红艳. 鸡球虫病的防治[J]. 甘肃畜牧兽医, 2005, 35(1): 30-32.
- [8] Guo F C, Kwakkel R P, Williams C B. Coccidiosis immunization: effects of mushroom and herb polysaccharides on immune responses of chickens infected with *Eimeria tenella*[J]. Avian Dis, 2005, 49(1): 70-73.
- [9] Lobago F, Worku N, Wossene A. Study on coccidiosis in Kombolcha Poultry Farm, Ethiopia[J]. Trop Anim Health Prod, 2005, 37(3): 245-251.

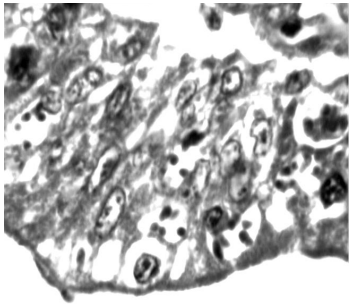


图 1 成熟的第 3 代裂殖子 (HE×1000)

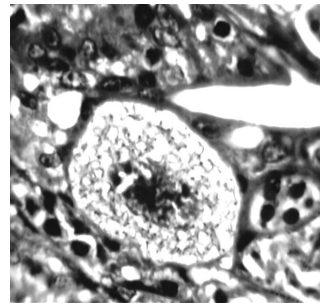


图 2 成熟的大配子体 (HE×1000)

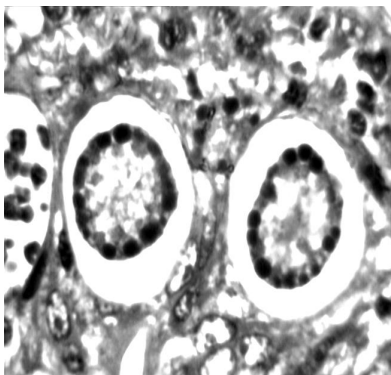


图 3 成熟的大配子体 (HE×1000)

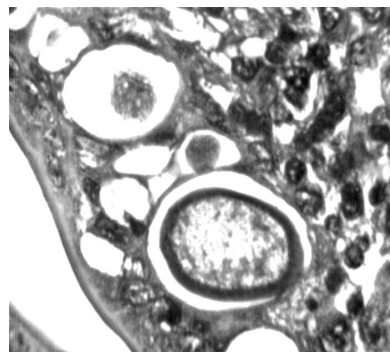


图 4 成熟的卵囊 (HE×1000)

# 金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定和药敏实验

宋德平, 朱芝秀, 王 萍

(江西农业大学动物科技学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:** 从江西某地发病死亡金鱼体内分离到6株呈 $\beta$ -溶血的革兰氏阴性杆菌, 对其进行鉴定、生化试验、动物试验, 鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)。对该菌的致病性和敏感药物试验发现6株菌均具有较强的致病性, 均能致死小鼠; 该菌对氯霉素、链霉素、诺氟沙星等高度敏感, 而对青霉素等药物不敏感。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; 分离鉴定; 生化试验; 药敏试验

**中图分类号:** S852.61<sup>7</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0026-03

嗜水气单胞菌(Ah)属弧菌科产气单胞菌, 广泛分布在江、河、湖中, 是鱼类、两栖类、爬行类和哺乳类动物的致病菌。可引起淡水鱼细菌性败血症, 蛙类的红腿病, 甲鱼的红脖子病、红底斑病、穿孔病、腐皮病等。鸟类、食鱼的水禽、爬行的鳄鱼都能被感染致病。哺乳动物如貂、野兔、牛等也可感染而引起败血症<sup>[1]</sup>。人感染后引起腹泻<sup>[2]</sup>。此病流行范围广, 遍及世界各地<sup>[1,2]</sup>。该病发病季节长(4-11月), 夏季为高峰期, 死亡率高达80%<sup>[1]</sup>。在水生动物上, 该病以体表和内脏器官严重出血的急性败血症为多, 皮肤溃疡及肠炎等慢性型亦较常见。

2008年5-6月, 某场的观赏金鱼不断死亡, 死亡率高达95%。死亡金鱼腹部膨胀, 肌肉、眼眶出血明显。本实验从病鱼体内分离到6株菌, 经鉴定为嗜水气单胞菌。现报道如下:

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 病料 某场死亡金鱼。

1.1.2 培养基 普通琼脂平板、5%兔血平板、麦康凯琼脂平板、普通肉汤、普通琼脂斜面, 自行配制。

1.1.3 药敏试纸 购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.1.4 生化微量发酵管 购自上海医学化验所。

### 1.2 实验方法

1.2.1 培养 ①分离培养: 无菌钩取肌肉组织, 划线接种普通琼脂平板, 放入28℃生化培养箱培养24 h, 观察并记录结果。②纯培养: 多次接种普通琼

脂平板得到大小、形态相似的稳定菌落。挑取典型菌落, 革兰氏染色, 镜检, 然后划线接种普通琼脂斜面, 制得纯菌种。③特性培养: 将各菌分别接种麦康凯琼脂平板、普通肉汤、5%兔血平板, 28℃培养24 h, 观察并记录结果。④生化培养: 将各菌接种于各微量生化发酵管中, 方法参考文献<sup>[3]</sup>。

1.2.2 毒力因子检测 ①溶血素检测: 将各菌肉汤培养物划线接种和点种5%兔血平板, 观察其溶血现象。②蛋白酶检测: 将分离菌接种到蔗糖胰蛋白胨肉汤中, 28℃、3 000 r/min摇床培养48 h后, 接种含1%脱脂奶蔗糖胰蛋白胨琼脂平板, 24 h后观察结果。③S蛋白检测: 将分离菌接种含0.003%刚果红普通琼脂平板上, 28℃培养72 h, 观察结果。

1.2.3 动物感染试验 将15只小鼠分为3组, 每组5只。I组: 腹腔注射肉汤培养物, 0.5 mL/只。II组: 腹腔注射经过3 000 r/min离心的无菌肉汤上清液, 0.5 mL/只。III组: 腹腔注射0.85%生理盐水, 0.5 mL/只, 作为对照组。

1.2.4 药敏实验 将各菌肉汤培养物均匀涂抹普通琼脂平板, 再贴上标准药敏试纸, 方法按文献<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 培养结果

2.1.1 分离培养结果 每个平板菌落形态相似, 为圆形, 大小一致, 直径1~3 mm。菌落表面光滑, 边缘整齐, 微凸, 呈乳白色。

2.1.2 纯培养结果 经多次接种得到大小、形态相似的稳定菌落。细菌染色, 镜检, 为革兰氏阴性多形

态杆菌。6株菌种分别命名为A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub>。

**2.1.3 特性培养结果** 麦康凯琼脂平板培养菌落呈淡红或淡黄, 半透明。5%兔血平板菌落呈灰白色, 菌落周围有清晰的β-溶血圈。普通肉汤均匀浑浊, 无菌膜。

**2.1.4 生化培养结果** 见表1。从表1中可知: 分

离菌接触酶试验呈阳性, 分解葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇, 还原硝酸盐, MR、V-P 试验为阳性, 不发酵乳糖, 可产生尿素酶, 不产生H<sub>2</sub>S。

**2.2 毒力因子检测结果**

**2.2.1 溶血素检测** 5%的兔血平板划线培养及点种发现菌落周围有清晰的β-溶血圈, 证明有

表1 生化培养结果

编号	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	V-P	MR	H <sub>2</sub> S	柠檬酸盐	硝酸盐	尿素	吲哚	接触酶
A <sub>1</sub>	+ <sup>1)</sup>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
A <sub>2</sub>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
A <sub>3</sub>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
A <sub>4</sub>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
A <sub>5</sub>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
A <sub>6</sub>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+

1): “+”表示阳性, “-”表示阴性

溶血素产生。

**2.2.2 蛋白酶检测** 菌落周围有清晰的溶蛋白圈, 证明产生了蛋白酶。

**2.2.3 S蛋白检测** 0.003%刚果红普通琼脂平板培养发现有菌落呈黑色, 说明有部分产生S蛋白。

**2.3 动物感染试验结果** I组、II组小鼠2天内全部死亡, 对照组全部健康存活。解剖死亡小鼠, 主要病变为皮肤、肌肉充血、出血, 内脏肿大、出血, 呈败血症。从I组死亡鼠中分离到原致病菌。

**2.4 药敏试验结果** 见表2。可知6株分离菌对环丙沙星、链霉素、氯霉素、诺氟沙星、复方新诺明和头孢哌酮高度敏感, 对阿米卡星、四环素、红霉素、头孢唑啉和壮观霉素中等敏感, 对青霉素、氨苄西林、头孢曲松、卡那霉素、新生霉素、克林霉素、万古霉素、强力霉素、痢特灵和乙酰螺红霉素不敏感。

**3 讨论与分析**

**3.1** 根据临床诊断, 菌体形态特征、培养特性、生化特性以及动物感染试验, 比照文献<sup>[5]</sup>, 可以确定该分离菌为嗜水气单胞菌。观赏鱼发生此病的报道很少, 在江西属首次报道。该生化培养的结果与以往报道<sup>[6,7]</sup>基本相同。只有某些特性方面存在差异, 其中A<sub>2</sub>, A<sub>5</sub>的V-P试验呈阴性, 可能是由于变异所致, 也可能是菌株之间的差异。

**3.2** 毒力检测实验的结果表明: 嗜水气单胞菌能产生溶血素、蛋白酶和S蛋白等毒力因子, 动物试

验表明AH产生的毒力因子有较强的致病作用, 这与以往报道<sup>[8]</sup>一致。

表2 药敏实验结果

药物	抑菌圈直径/(mm)					
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>
青霉素	8	0	0	0	9	0
氨苄西林	0	0	14	0	0	0
阿米卡星	17	12	16	17	19	15
头孢哌酮	20	14	23	23	20	23
头孢曲松	12	0	0	0	0	0
头孢唑啉	14	15	25	22	16	21
诺氟沙星	19	17	24	26	24	23
环丙沙星	22	22	22	24	23	24
四环素	9	9	9	11	12	12
卡那霉素	11	15	15	18	18	16
链霉素	16	12	14	15	15	14
新生霉素	14	14	19	15	14	15
红霉素	17	17	17	17	14	15
氯霉素	21	25	25	25	24	18
克林霉素	0	0	0	0	0	0
万古霉素	9	10	10	7	10	9
壮观霉素	19	19	28	26	26	13
强力霉素	11	14	13	12	12	12
痢特灵	11	11	12	11	12	11
乙酰螺红霉素	0	0	0	0	0	0
复方新诺明	25	26	9	25	14	25

**3.3** 与以往报道比较<sup>[7]</sup>, 本试验发现对该菌敏感的药物还有环丙沙星、诺氟沙星、壮观霉素等, 在

临床上可以应用。但据报道,嗜水气单胞菌能生成生物被膜(Biofilm, BF),形成耐药屏障<sup>[9,10]</sup>。张吉红等<sup>[11]</sup>报道,4倍最小杀菌浓度(MBC)的恩诺沙星可以完全杀灭未生成BF的嗜水气单胞菌,而形成了BF的菌株需32倍MBC的恩诺沙星才可能在24h内完全杀灭。因此抗生素不能多次重复使用,现在人们正在试图寻找生物药物代替抗生素,在临床上我们建议应用大蒜素。

**3.4 饲养观赏鱼重在疾病预防。**首先,要选好种;其次,应选择水质好、清澈透明、无污染、无病菌的水,并且定时更换;再次,要选好饲料,可选择含有酵母菌的人工合成饲料。在饲养过程中,用AH灭活疫苗浸泡金鱼以达到预防的效果。

**参考文献:**

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, (16): 282-288.

[2] 杨守民, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性[J]. 疾病控制杂志, 2006, 10(5): 511-514.

[3] 姚火春. 兽医微生物实验指导[M]. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2006.

[4] 何小青. 卫生防疫细菌检查[M]. 南昌: 新华出版社, 1989

[5] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第八版. 中国科学院微生物研究所北京: 科学出版社, 1984.

[6] 刘加波, 谢芝勋, 邓显文, 等. 罗飞鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定[J]. 中国渔业, 2006, 26(4): 100-103.

[7] 朱芝秀, 曾志明, 何后军, 等. 江西地区嗜水气单胞菌流行株的生物学特性[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(4): 623-627

[8] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌的蛋白酶对鲫鱼一致病性的研[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(2): 80-84.

[9] Bakken J S, Sanders C C, Clark R B, et al.  $\beta$ -lactam resistance in *Aeromonas* spp. caused by inducible  $\beta$ -lactamases active against penicilins, cephalosporins and carbapenems[J]. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988, 32(9): 1314-1319.

[10] Costerton j w, Stewart P S, Greenberg E P, et al. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, (284): 1318-1322.

[11] 张吉红, 陆承平. 嗜水气单胞菌生物被膜对其耐药性的影响[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 498-502.

\*\*\*\*\*  
(上接第10页)

[12] Bikle D D, Nemanic M K, Whitney J O, et al. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D3[J]. *Biochemistry*, 1986, (25): 1545-1548.

[13] Liu P T, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response[J]. *Science*, 2006, (311): 1770-1773.

[14] Schaubert J, Dorschner R A, Coda A B, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism [J]. *J Clin Invest*, 2007, (117): 803-811.

[15] Dietrich T, Joshipura K J, Dawson-Hughes B, et al. Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and periodontal disease in the US population[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, (80): 108-113.

[16] Koeleman B P, Valdigem G, Eerligh P, et al. Seasonality of birth in patients with type 1 diabetes[J]. *Lancet*, 2002, (359): 1246-1247.

[17] Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, (78): 4990-4994.

[18] Jensen S S, Madsen M W, Lukas J, et al. Inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery[J]. *Mol Endocrinol*, 2001, (15): 1370-1380.

[19] Gedlicka C, Hager G, Weissenbock M, et al. 1,25(OH)

2Vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck[J]. *J Oral Pathol Med*, 2006, (35): 472-478.

[20] Park W H, Seol J G, Kim E S, et al. Induction of apoptosis by vitamin D3 analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase[J]. *Br J Haematol*, 2000, (109): 576-583.

[21] De Haes P, Garmyn M, Degreef H, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2003, (89): 663-673.

[22] Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2005, (26): 429-440.

[23] Palmer H G, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, et al. The Vitamin D Receptor Is a Wnt Effector that Controls Hair Follicle Differentiation and Specifies Tumor Type in Adult Epidermis[J]. *PLoS ONE*, 2008, (3): e1483.

[24] Dhawan P, Peng X, Sutton A L, et al. Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, (25): 472-487.

# 生猪“瘦肉精”残留的危害及防治对策

邹淑当<sup>1</sup>, 卢沛炯<sup>2</sup>, 李月文<sup>3</sup>, 黎国辉<sup>3</sup>

(1. 东莞市动物卫生监督所石龙分所; 2. 东莞市动物卫生监督所万江分所; 3. 东莞市动物卫生监督所石碣分所, 广东 东莞 523000)

中图分类号: S852.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0029-02

随着社会的发展和水平的提高,人们对肉品质量和食品安全性的要求在不断提高。食品安全问题是关系到人民健康和国计民生的重大问题,而滥用饲料添加剂、兽药残留,如“瘦肉精”、莱克多巴胺、氯霉素、磺胺类药物等是目前或者可以说是今后一段时期内食品安全的突出问题之一。本文从“瘦肉精”对人体的危害、检测技术及防治措施作简要的介绍。

## 1 “瘦肉精”的理化特性

“瘦肉精”学名盐酸克伦特罗,又称克喘素、氨哮素,化学名为2-[(叔丁氨基)甲基]-4-氨基-3,5-二氯苯甲醇。它呈白色结晶粉末,无臭,味苦,溶于水和乙醇,其性质稳定,要加热至近200℃才会分解。“瘦肉精”是人工合成的 $\beta$ -肾上腺素能受体兴奋剂之一,是一种强效激动剂。在治疗剂量下,有强而久的松弛支气管平滑肌的作用,其药用制剂常用盐酸盐制成片剂或膜剂,以及加入洋金花制成的称为“喘立平”气雾剂。但作为兽药或禽饲料添加剂,则属于违禁品。

## 2 “瘦肉精”对动物的作用及特征

**2.1 “瘦肉精”对动物的作用** “瘦肉精”作为饲料添加剂,源于20世纪80年代初。将一定量的盐酸克伦特罗添加在饲料中,可明显促进动物生长率和饲料转化率,并增加瘦肉率10%左右<sup>[1]</sup>。实验证明,饲料中添加3~5 mg/kg,就可使猪的瘦肉率提高9.7%,脂肪下降14.1%。用5~10倍治疗量时,即可重新分配脂肪与肌肉的比例<sup>[2]</sup>。于是用于治疗哮喘的“盐酸克伦特罗”摇身一变,成了猪吃的“减肥”药。虽然一直未得到国家主管部门的认可,但“瘦肉精”却一度在饲料加工企业和养猪专业户之中颇受欢迎,饲喂“瘦肉精”的生猪其瘦肉率会显著提高,而且能使猪毛色红润光亮,收腹,卖相好。

**2.2 “瘦肉精”猪的特征** 添喂“瘦肉精”的生猪

具有以下典型特征:外观该生猪较其它猪皮肤光洁,白里泛红;被毛少而松软;臀部结实上翘,且外表呈现红亮状,腹部匀称,无下坠感;背部体表经驱打后易见驱打伤痕。体态行走不灵活、惰行,易发生跛行,前后肢在运输中易发生开叉,蹄部易受伤并发生其它感染,大运动易造成死亡。生猪宰后肌肉色泽与普通猪肉相比较鲜红,脂肪层非常薄。

## 3 对人的危害及中毒症状

一般家庭烹调的方法根本无法破坏“瘦肉精”的毒性。因药理作用强,一般情况下20 mg就可出现中毒症状。如果长期食用含“瘦肉精”的食品,可能导致染色体畸变,还会诱发恶性肿瘤。克伦特罗进入动物体内,残留最高的是动物的眼睛和毛发,其次是肝、肺、肾和骨髓等器官,肌肉中的含量较肝、肺低很多。“瘦肉精”用量过大会对动物和人(间接)的肝脏、肾脏等产生相当大的毒害作用<sup>[3,4]</sup>。

对人体的副作用主要表现在激动心脏 $\beta_1$ 受体(特别是原有心律失常的病例),可见心动过速、心室早搏、ST段压低与T波振幅下降。还可引起四肢、面颈部骨骼肌震颤,尤其是交感神经功能亢进的病例更易发生。过量应用时或与糖皮质激素合用时,可引起低钾血症,从而导致心律失常。反复用药易发生低敏感现象,表现为支气管扩张作用明显减弱。人食用了有较高浓度“瘦肉精”残留的动物组织会出现心跳加快、手震、头痛、恶心、呕吐、晕眩等症状,特别是对高血压、心脏病、甲亢、前列腺肥大等疾病患者危险更大。一般食后,15 min至6 h出现症状,症状持续90 min至6 d。人的中毒症状:面红、口渴、皮肤过敏红色丘疹,心情烦躁不安宁。失眠、手指震颤、足有沉感,严重时不能站立。肌肉颤动伴有疼痛。心动过速,乏力、恶心呕吐、耳鸣、头痛、头晕等系列代谢紊乱、障碍性中毒症状。长期食用可致染色体畸变诱发恶性肿

瘤。一般因人的体质、免疫力,食用数量上的差异,中毒症状的出现也有差别。一般讲,最长可持续42 h之久。虽经抢救、恢复程度也各自不同<sup>[5]</sup>。

#### 4 “瘦肉精”的检测方法

**4.1 酶联免疫分析法(ELISA)** 这是最常用方法之一,已经有商品化试剂盒出售。将盐酸克伦特罗偶联到牛血清白蛋白上作为抗原免疫制备抗体,将抗体包被到反应板上,再加入抗原(样品和标准品)及与抗原竞争相同抗体结合位点的酶标记物,然后加入与酶结合物出现颜色反应的底物,并测定吸光值。在对数坐标纸上,以标准品的含量为横坐标,吸光值为纵坐标绘制标准曲线。根据样品的吸光值,在标准曲线上找出样品含量,吸光值与样品含量成反比。检测结果有较好的稳定性和较高的标准回归曲线。

**4.2 气相色谱-质谱联用法(GC/MS)** 可用于动物毛发、尿液及组织中盐酸克伦特罗等 $\beta$ -兴奋剂定性定量分析。先将样品用酶消化,然后通过固相萃取净化,分离的药物残留经过三甲基硅基三氟乙酰胺等衍生后用GC/MS测定。盐酸克伦特罗回收率为75.5%,检测下限为0.5 $\mu$ g/kg。

**4.3 高效液相色谱法(HPLC)** 此法具有专属性好、选择性高和灵敏性高等优点,适合于微量克伦特罗检测。猪血浆用NaOH碱化后,用乙醚、丁醇混合液抽提,再经沙浴氮气吹干,残留物用流动相溶解后用HPLC测定。HPLC法是检测克伦特罗的最终确认方法之一,但是检测费时,花费多,在实际应用中受到一定限制。

**4.4 胶体金检测卡法** 此法速度快,适合于基层单位作初步筛选检测。用BSA偶联的克伦特罗分子于胶体金颗粒结合后,包被在醋酸纤维素膜上;在硝酸纤维素膜上将克伦特罗抗体和BSA抗体分别包被在检测区和质控区。加入样品后,样本中的克伦特罗分子与克伦特罗-BSA-胶体金偶联物一起层析泳动到检测区竞争与克伦特罗抗体结合,剩余的克伦特罗-BSA-胶体金继续泳动到质控区与抗体结合。当样品中的克伦特罗浓度超过一定量后,胶体金偶联物就不能与克伦特罗抗体结合,只有质控区出现紫红色线条,检测区不出现线条;相反则质控区和检测区都出现线条。此外,还有放射免疫分析法,薄层色谱法,液相色谱-质谱联用法等。

### 5 东莞市“瘦肉精”残留现状及控制对策

**5.1 残留现状及原因** 东莞市从2003年3月起

开展生猪“瘦肉精”残留检测工作,最初按照1%比例对上市生猪进行抽检。生猪阳性检出率从开始时的2%下降到2004年底的1%左右。市内的生猪养殖场自2004年以来已经很少检出阳性生猪,检出阳性生猪基本上都是由外市调入的。到2005年,东莞市实行“四清理”,外市调入畜禽及其产品主导了肉食市场,“瘦肉精”阳性检出率一度出现了反弹,并在2006年接连发生2起“瘦肉精”中毒事故。随后,市农业部门加大检测力度,结合胶体金检测卡和酶联检测法,在镇(街)定点屠宰场实施“天天检、车车检、批批检”与不定期抽检,使“瘦肉精”检出率逐年呈下降趋势。

由此可见,虽然国家检验检疫部门加强对非法使用“瘦肉精”行为的打击力度,使中毒案件和非法使用情况得到一定程度的控制,但仍有部分畜主铤而走险,存在着非法使用的情况。主要原因有:(1)目前虽然禁止药品生产企业向非医疗机构和个体出售盐酸克伦特罗,但由于法规不完善,仍可通过其他渠道流入养殖企业和个体业主。(2)各地对大型规模场有监控,但对中小养猪场、个体养猪户的监控力度不足。(3)各省市、地区的监管力度存在着较大的差异,不能形成合力而出现漏洞,导致食用中毒事故屡有发生。

#### 5.2 控制残留的对策

**5.2.1 加强舆论宣传** 进一步加强舆论宣传,通过各种媒体宣传“瘦肉精”对人类的危害,认清“瘦肉精”的本质。加强生产者的职业道德教育,同时提高消费者识别、抵制能力。大力宣传畜产品安全生产的意义和要求,强化畜产品卫生安全意识,增强生产者的产品标准意识、食品质量安全意识;及时通报查处“瘦肉精”案例,以震慑不法分子,对于打击不力的连续发生“瘦肉精”中毒的地区予以曝光,停运、停销违规地区的生猪,确保畜产品安全。

**5.2.2 加大经费投入以扩大检测范围** 就目前情况来看,“瘦肉精”监测大多集中在大城市,而在偏远的地区,设施落后,经费不足无法开展“瘦肉精”检测工作,导致出现“瘦肉精”检测空白区。因此国家应加大必要的经费投入,保证更好地开展“瘦肉精”检测工作。加强对养猪企业的日常监督和生猪出栏前的“瘦肉精”残留检测,在当前生猪尿样检测的基础上扩大监测覆盖面,增加抽检频率,切实加强对生猪源头的检查监督。

(下转第40页)

## 伪狂犬病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立

田云, 任裕其, 屈源泉, 孙彦伟, 卢受昇, 卢洪芬, 李明, 孔令辰, 王连想  
(广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:** 根据猪伪狂犬病毒 gD 基因的序列, 设计和合成了一对特异的可用于检测伪狂犬病毒的 PCR 引物和一条 Taqman 荧光探针, 采用 LightCycler<sup>®</sup> 480 荧光定量 PCR 仪, 建立了一种可实时定量检测猪伪狂犬病毒的荧光定量 PCR 技术。该方法的线性范围为  $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^{10}$  拷贝, 灵敏度可达 2 拷贝, 比常规 PCR 高 100 倍。该方法检测时间短, 速度快, 仪器的运行时间仅为 1h, 特异性明显高于常规 PCR。对 15 株猪伪狂犬病毒进行了检测, 结果均为阳性; 与猪细小病毒和鸭瘟病毒无非特异性反应。与病毒分离培养和常规 PCR 相比较, 该方法具有快速、灵敏、特异、定量、重复性好的优点, 可望用于临床上伪狂犬病的检测和病毒分布的研究等。

**关键词:** 猪伪狂犬病毒; 荧光定量 PCR; 临床检测

中图分类号: S854.41

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0031-03

## Establishment of a quantitative real-time PCR method for detection of pseudorabies virus

Tian Yun, Ren Yuqi, Qu Yuanquan, Sun Yanwei, Lu Shousheng, Lu Hongfen, Li Ming, Kong Lingchen, Wang Lianxiang  
(Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** According to the sequences of the gD gene of pseudorabies virus (PRV), one pairs of primers and one Taqman probe were designed and synthesized for detection of PRV. By using LightCycler 480 real-time PCR machine, a real-time and quantitative PCR method was established. The dynamic range of the quantitative real-time PCR was from  $1.0 \times 10^1$  to  $1.0 \times 10^{10}$  copies and the lowest DNA detection limit was 2 copies, which was 100 fold better than regular PCR. The detection method was rapid and only one hour was needed for detection on PCR machine. It was more specific than regular PCR. Fifteen pseudorabies virus strains were detected by this PCR method and all were positive. There were no amplification with swine parvovirus and duck plague virus. Compared with virus isolation and regular PCR, this method was more rapid, sensitive, specific and repeatable. It can be used on the detection for PRV and the research on tissue distribution of PRV, etc.

**Key words:** Pseudorabies virus (PRV); quantitative real-time PCR; clinical detection

猪伪狂犬病 (Pseudorabies, RP) 是由疱疹病毒科的猪伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, RPV) 引起的猪、牛、羊等多种家畜、家禽及野生动物的一种以发热、奇痒 (猪除外), 呼吸和神经系统疾病为特征的急性传染病, 又称 Aujeszky 病<sup>[1]</sup>。

我国于 1947 年首次报道猪的伪狂犬病<sup>[2]</sup>, 并于 1956 年开始陆续在我国各地的猪群中发生, 已成为严重危害我国养猪业的疾病之一。为了控制伪狂犬病的发生及带来的危害, 自 20 世纪 70 年代中期以来, 在我国多省份采用基因工程缺失疫苗来预防本病, 但随之而来也带来了野毒潜伏感染的弊端, 导致野毒可长期在机体内复制和向外排毒, 从而无法真正地消除猪伪狂犬病。随着集约化养殖的

进一步发展, 在个别省份猪伪狂犬病的危害也日趋严重<sup>[3]</sup>。基于 ELISA、普通 PCR 和病毒分离等方法存在的敏感性低、耗时长等不足, 开发一种新的荧光 PCR 检测方法来弥补不足已是势在必行。gD 基因是 PR 病毒复制的必需基因, 作者根据 GenBank 已发表的 gD 基因序列设计了一对保守的引物和一条探针, 建立了 PRV 检测的荧光定量 PCR 方法。

### 1 材料和方法

**1.1 毒株和细胞** 伪狂犬病毒 Min A 株等 15 株病毒由本实验室保存, 其中 Min A 株为伪狂犬病毒标准毒株, 另 14 个毒株由本实验室分离。伪狂犬病毒疫苗、鸭瘟弱毒疫苗和猪细小病毒用于特异性检验。BHK 细胞由本实验室保存, 用于伪狂犬病毒增殖。

**1.2 DNA 提取试剂盒、细胞培养基和主要试剂** MEM 培养基购自 GIBCO 公司, 新生牛血清购自杭州四季青, TIANamp Genomic DNA Kit 购自天根生物技术有限公司, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System 胶回收试剂盒购自 Promega 公司, Premix Ex Taq(perfect real time) 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, DH5 $\alpha$  感受态细胞购自广州科威生物工程有限公司。

**1.3 引物和探针** 根据 GenBank 已发表的 gD 基因序列设计了一对保守的引物和一条探针, 上游引物 F1: 5'-CCGAAGTGTACGTGCGGTG-3'; 下游引物 R1: 5'-GGTCAACGAGGGCCAGTAC-3'; 荧光探针 P1: 5'-FAM-CCACGCGGGCGAACGGGCAC-3', 荧光探针 5'-端标记的荧光报告基团是 FAM, 3' 端标记的淬灭基团是 ECLIPSE。引物和探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成, 产物长度是 136 bp。

**1.4 仪器** 荧光定量 PCR 仪采用罗氏公司的 LightCycle® 480 仪器, 紫外分光光度计采用基因公司的 NanoDrop ND-1000 分光光度计。

**1.5 病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定** 采用微量法测定伪狂犬病毒 JM-PJ 株在 BHK 细胞上的感染力。病毒液进行 10 倍系列稀释(从 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-11</sup>)后, 分别接种于长满单层细胞的 96 孔微量细胞培养板上, 每个稀释度接种 8 孔, 每孔 100  $\mu$ L, 另 8 孔加维持液作为阴性对照, 于 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。从接毒 12 h 后开始, 每 6 h 观察一次 CPE, 培养 96 h 后判定结果。按照 Reed-Muench 氏法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。

**1.6 病毒 DNA 的提取** 参照天根生物技术有限公司的 TIANamp Genomic DNA Kit 说明书进行, 并略作改进。

**1.7 阳性标准品的构建** 以标准株 MinA 株的 DNA 为模板, 用 F1 和 R1 引物进行 PCR 扩增 gD 基因, 电泳后切胶回收 gD 基因, 回收产物经紫外分光光度计测量其 OD 值 > 1.8 后可用做标准品。随后用 TAKARA 的 EASY Dilution 将其稀释至 0.5  $\times$  10<sup>1</sup> ~ 0.5  $\times$  10<sup>10</sup> copies/ $\mu$ L, 用做标准品。将其克隆到 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 送上海生物工程有限公司测序验证。

**1.8 荧光定量 PCR 方法的建立** 反应体系为 20  $\mu$ L, 其组成为: Premix Ex Taq 10  $\mu$ L, F1 (20  $\mu$ mol/L) 0.7  $\mu$ L, R1 (20  $\mu$ mol/L) 0.7  $\mu$ L, 探针 P1 (2  $\mu$ mol/L) 2.0  $\mu$ L, 标准品或待检样品 DNA 2  $\mu$ L, DEPC 水 4.6  $\mu$ L。荧光定量在 LightCycle® 480 仪器上进行。检测条件为: 95°C 8 min 预变性; 95°C

10 s, 60°C 20 s, 扩增 40 个循环, 每个循环结束时检测荧光, 自动计算 Ct 值并给出定量结果。

## 2 结果

**2.1 标准曲线及荧光定量 PCR 的灵敏度** 以 10 倍系列稀释的标准品 (0.5  $\times$  10<sup>10</sup> copies/ $\mu$ L ~ 0.5  $\times$  10<sup>1</sup> copies/ $\mu$ L) 为定量检测模板, 每个浓度 2  $\mu$ L, 各 4 个重复, 在 LightCycle 480 仪器上检测, 得到动力学曲线(图 1)和标准曲线(图 2), 可知模板 DNA 浓度在 10<sup>10</sup> ~ 10<sup>1</sup> copies 范围内有很好的线性关系, 扩增效率为 2.006。

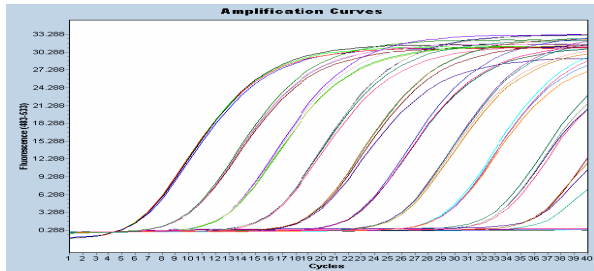


图 1 动力学曲线

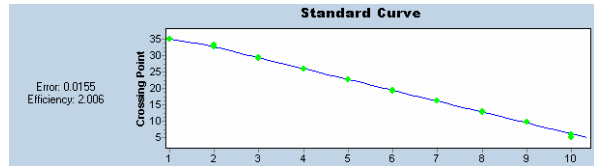


图 2 荧光定量标准曲线

取 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-8</sup> 倍稀释的 PRV 病毒的 DNA 做为检测样品, 进行荧光定量 PCR 检测, 结果 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-6</sup> 均能检出, 10<sup>-7</sup> 开始超出定量范围。其中 10<sup>-6</sup> 为 1.74 个拷贝, 表明此实验中建立的荧光定量 PCR 方法可以检测到 2 个拷贝的模板。

**2.2 测序结果分析** MinA 株的 PCR 产物经 T 载体克隆后, 送上海生物工程有限公司测序, 测序结果经 GenBank 比对后, 证实确为伪狂犬病毒 gD 基因, 表明本文建立的方法可用于伪狂犬病毒的检测。

**2.3 特异性** 对鸭瘟病毒和细小病毒进行荧光定量 PCR 检测, 结果均无荧光信号出现, 表明该 PCR 检测方法具有良好特异性。

**2.4 重复性** 对 3 份不同的 PRV 病毒样品进行组间重复性检测, 结果重复性检测的组间变异系数(CV%)分别为 0.005%, 0.004% 和 0.009%, 远小于 5%, 表明该方法具有良好的重复性(表 1)。

表 1 三份不同 PRV 病毒样品的组间重复性检测结果

样品号	CP			标准误	平均值	变异系数
1	25.94	25.69	25.79	0.125831	25.80667	0.005
2	18.99	18.93	18.84	0.075498	18.92	0.004
3	30.64	30.27	30.13	0.263502	30.34667	0.009



**2.5 细胞培养、常规 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法的比较** 将 PRV 毒在 BHK 细胞上测定 TCID<sub>50</sub>, 结果 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> 倍稀释毒各有 8 孔、7 孔和 3 孔出现 CPE, 该 PRV 毒 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-4.7</sup>/0.1 mL, 比荧光定量 PCR 的灵敏度低 60~100 倍。将 10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup> 倍稀释的 PRV 病毒 DNA 模板, 进行常规 PCR 检测, 经 2%琼脂糖电泳显示, 常规 PCR 的最小检出量为 10<sup>-4</sup> 倍稀释 DNA, 比荧光定量 PCR 灵敏度低 100 倍。

**2.6 15 株伪狂犬病毒和伪狂犬病弱毒疫苗的检测** 对包括 MinA 株在内的 15 株伪狂犬病毒和伪狂犬病弱毒疫苗均进行了荧光 PCR 检测, 结果均为阳性 (图 3), 表明其具有很高的检出率, 可望用于临床上伪狂犬病的检测和病毒分布的研究等。

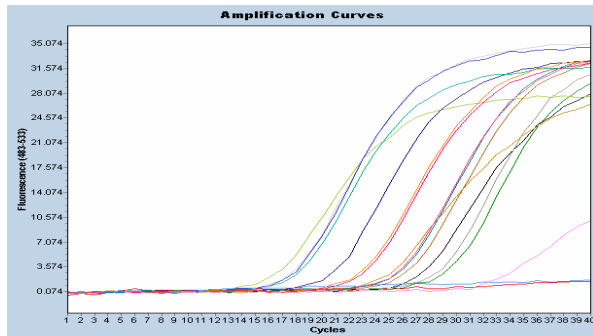


图 3 15 株猪伪狂犬病毒的荧光定量 PCR 检测结果

### 3 讨论

猪伪狂犬病是由猪伪狂犬病病毒引起的多种家畜和野生动物的一种传染病。猪是该病毒贮存宿主和传染源, 常常引起母猪出现繁殖障碍及初生仔猪大批死亡; 成年猪则系隐性感染, 长期带毒排毒, 严重影响种猪场生产及优良品种的推广, 给养猪业造成极大的损失<sup>[4]</sup>。

临床上快速诊断是防治猪伪狂犬病的重要措施之一。虽然病毒分离<sup>[5]</sup>、gE 抗体检测<sup>[6]</sup>、常规 PCR 检测<sup>[7,8]</sup>等方法均曾在伪狂犬病毒的检验过程中发挥了一定作用, 但由于病毒分离时间长, gE 抗体仅证明曾经感染过, 常规 PCR 检测敏感性低等原因, 荧光定量 PCR 在临床检测中的优势也就越加明显。

本实验所建立的荧光定量 PCR 方法比常规 PCR 灵敏度高 100 倍, 可以检测到低至 2 个拷贝的 PRV 病毒模板, 可以实时监控检测结果, 特异性强, 时间短, 且无 PCR 产物的污染和 EB 的污染, 可保证实验结果的准确性和实验人员的安全性。此外, 本实验采用 MinA 株的 PCR 产物, 而非连接的阳性质粒作为荧光定量 PCR 的标准品, 避免了在荧光定量 PCR 过程中存在的环型 DNA 质粒和线性 DNA 模板

扩增效率不一致的问题, 定量结果更为准确。

本方法是采用罗氏公司的 LightCycle<sup>®</sup>480 仪器建立的, 其采用革新的 ThermoBase<sup>™</sup> 技术保证了加热的均一性, 结合独特的散热器和高性能风扇保证散热的快速, 确保了均一的孔间温度, 实现了完美的定量准确性和重复性。3 份不同样品组间重复性的变异系数最低为 0.004%, 最高为 0.009%, 差异很低, 从而避免了在很多仪器上出现同一样品定量数据偏差很大的现象。此外, 它的反应速度很快, 完成此实验建立的 PRV 病毒的检测反应只要 1 h, 较其他同类仪器可缩短 20 min 左右。

鸭瘟病毒与伪狂犬病毒同样为疱疹病毒科的成员, 亲缘关系较近, 故被用于特异性检验。初始建立了针对 gB 基因设计的荧光定量 PCR 方法, 结果发现, 其对鸭瘟病毒有一定非特异性的扩增, 在三十几个循环处扩增曲线略有抬头, 从而会影响检测结果的判定, 故针对 gD 基因重新设计了一套可检测伪狂犬病毒的引物和探针, 检测的特异性很好, 可有效地被用于 PRV 病毒的荧光定量 PCR 检验。

本实验建立的伪狂犬病毒 gD 基因检测方法可检测所有伪狂犬病毒 (包括疫苗毒), 仍无法区分野毒和疫苗毒 (gE 缺失毒), 针对此特点, 今后将继续研发针对 gE 基因的荧光定量 PCR 检测方法。两种方法的联合应用将可有效解决临床上遇到的基因突变野毒, gE 基因缺失野毒的检测等问题。

### 参考文献:

- [1] 斯特劳, 阿莱尔, 蒙加林, 等. 猪病学[M]. 第八版. 北京: 中国农业大学出版社. 2000.
- [2] 刘永纯. 阿杰斯基氏病在中国发生之一例[J]. 中华医学杂志, 1947, 34(1): 501-502.
- [3] 周斌, 苏鑫铭, 张素芳. PCR 快速检测伪狂犬病病毒野毒感染[J]. 中国病毒学, 2004, 19(6): 612-615.
- [4] 殷霞, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科技出版社, 1997.
- [5] 韩勇, 李文刚, 项朝荣, 等. 猪伪狂犬病病毒的分离和鉴定[J]. 动物医学进展, 2007, 28(3): 43-45.
- [6] 柴虹, 范忠军, 陈义平, 等. 猪伪狂犬病血清抗体 gE-ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(7): 9-12.
- [7] Huang C, Hung J J, Wu C Y, et al. Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101(3): 209-214.
- [8] Balascha M, Pujolsb J, Segale sa J, et al. Study of the persistence of Aujeszky's disease(pseudorabies)virus in peripheral blood mononuclear cells and tissues of experimentally infected pigs[J]. Veterinary Microbiology, 1998, (62): 171-183.

# 不同时期 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒的 HA 和 NA 基因进化树及基因变异率线性回归分析

潘德敏<sup>1</sup>, 江经纬<sup>2</sup>, 张婷婷<sup>3</sup>

(1. 广东省农业干部学校, 广东 广州 510500; 2. 香港大学生物科学院, 中国 香港;  
3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 利用 Genbank 上从 1996-2007 年的所有的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因进行进化树分析, 基因变异率线性回归分析表明 1996-2000 年的 HA 基因和 NA 基因的变异率要明显低于 2000-2007 年间的变异率, 其原因也许与 2000-2007 年间东南亚各国大量使用疫苗有关。

**关键词:** H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒; HA 基因; NA 基因; 进化树; 基因变异率; 线性回归

**中图分类号:** S854.4<sup>+</sup>3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1005-8567(2009)04-0034-04

## Phylogenetic and linear regression analysis on HA and NA gene of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus during different periods

Pan Demin<sup>1</sup>, Jiang Jingwei<sup>2</sup>, Zhang Tingting<sup>3</sup>

(1. Guang Dong Agricultural Administrative School, Guangzhou 510500, China; 2. The University of Hong Kong, School of Biological Science, Hong Kong SAR, China; 3. South China Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The sequences of HA genes and NA genes of all H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian influenza viruses isolated from 1996 to 2007 had been downloaded from GenBank for phylogenetic analysis. Linear regression results indicated that the evolutionary rates of HA and NA gene from 1996 to 2000 were significantly lower than those from 2000 to 2007. This result probably was associated with the massive application of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> inactivated vaccine in the countries of South East Asian from 2000 to 2007.

**Key words:** H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus; HA gene; NA gene; phylogenetic tree; evolutionary rate; linear regression

### 1 前言

H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒是 A 型流感病毒的一种, 具有高传染性并引起鸟类发病及死亡的病毒的特点<sup>[1]</sup>。流感病毒的 HA 基因和 NA 基因分别编码血液凝集素 (hemagglutinin) 和唾液酸酶 (又称为神经氨酸酶, neuraminidase)<sup>[2]</sup>, 两者在病毒感染的作用虽然不同, 但两者的作用都是在识别唾液酸糖链受体时发挥作用。唾液酸糖链受体则作为流感病毒的配体介导病毒进入宿主细胞内。水禽被认为是流感病毒的天然病毒库, 因为所有 A 型流感的 HA 亚型 (H<sub>1</sub>-H<sub>15</sub>) 和 NA 亚型 (N<sub>1</sub>-N<sub>9</sub>) 都在水禽体内发现<sup>[3]</sup>。

1996 年, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒在中国的广东省首次发现<sup>[4]</sup>。1997 年, 香港出现了人的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病例, 18 个人感染, 6 人死亡<sup>[5-6]</sup>。1996 年 HA 基因与 1997 年香

港爆发的感染人型的禽流感 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒的 HA 基因高度相似<sup>[7-9]</sup>。随后, 香港政府把香港的活鸡全部处死, 从而有效避免了人型的禽流感 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒的大流行。但是在中国沿海的几个省份该 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒陆续在健康的水禽身上被分离<sup>[10-15]</sup>。1996-2003 年期间, 中国国内没有禽流感大流行的报道。2004 年, 由于东南亚国家发生高致病性 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒大流行, 随后国内多个省份也出现了高致病性 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒流行<sup>[16-17]</sup>。2005 年, 中国的青海湖又爆发了斑头雁的高致病性 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒流行, 随后国内多个省份也有高致病性 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒流行的报道<sup>[18]</sup>。

由历史数据可以知道东南亚的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的流行情况大致可以分为两个时期, 第一个时期为 1996-2000 年, 该时期的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒流

行的主要特征表现为在水禽中发病居多, 在鸡中发病较少; 第二个时期为 2000–2007 年, 该时期的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒流行的主要特征表现为在水禽、鸡和其他多种野生禽鸟中发病, 特别在 2003–2005 年间出现了 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒在东南亚多个地方流行。

为了从分子水平上分析其流行特征, 追溯 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 最初的源头, 以及揭示一些由于 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 疫苗大量使用, 在免疫压力下 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒所出现的新变化趋势。本文从 Genbank 上下载从 1996–2007 年以来的所有 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因序列, 用 Neighbour-joining 法建立两个基因在不同时期的进化树 (bootstrap 为 1 000), 并对各毒株的变异率按其分离年份进行线性回归分析。

## 2 材料与方法

**2.1 数据库** 1996–2007 年以来的所有 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因序列均从 Genbank 上下载, 具体序列号略, HA 基因序列共 320 条, NA 基因序列共 256 条。

**2.2 分析软件** MEGA 4.0, Microsoft Office 与 LinearRegression。

**2.3 HA 基因的序列比对、进化树分析和线性回归分析** 将 HA 基因序列共 320 条的 fasta 格式文件导入 MEGA 4.0, 然后将核苷酸序列转换成蛋白质序列, 选择完整的开放式阅读框去除其他多余的部分, 运行 Clustal W 程序进行序列比对, 再将比对后的蛋白质序列换回核苷酸序列, 此时运行 Neighbour-joining 法, 在核苷酸序列比对结果基础上建立 bootstrap 为 1000 的进化树。将进化树结果以 newick 格式输出, 将 newick 格式的进化树文件导入 LinearRegression 可以得出不同序列的变化率, 然后将结果导入 excel 中制成图表。

**2.4 NA 基因的序列比对、进化树分析和线性回归分析** 将 NA 基因序列共 256 条的 fasta 格式文件导入 MEGA 4.0, 然后将核苷酸序列转换成蛋白质序列, 选择完整的开放式阅读框去除其他多余的部分, 运行 Clustal W 程序进行序列比对, 再将比对后的蛋白质序列换回核苷酸序列, 此时运行 Neighbour-joining 法, 在核苷酸序列比对结果基础上建立 bootstrap 为 1000 的进化树。将进化树结果以 newick 格式输出, 将 newick 格式的进化树

文件导入 LinearRegression 可以得出不同序列的变化率, 然后将结果导入 excel 中制成图表。

## 3 结果

**3.1 HA 基因的进化树分析** 如图 1 所示, 1996–2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因大致可以分为两群, 1996–1997 年和 1997–2000 年, 地点分布在东南亚一带为主。

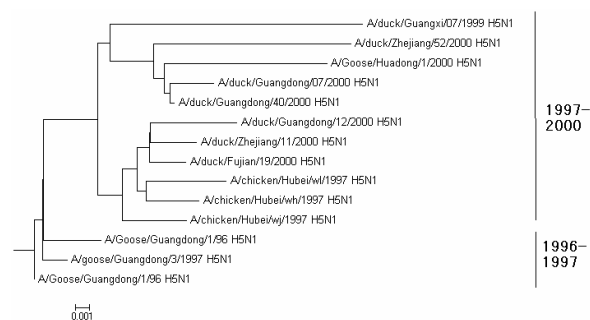


图 1 1996–2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因进化树形态 2000–2007 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因不能明显分群, 但是随着时间的推移进化树的分支不断增多, 这说明 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因的变异速度在变快, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的宿主也呈现多种, 除了水禽和鸡外还包括多种的野生禽鸟。

**3.2 HA 基因的线性回归分析** 如图 2 所示, 1996–2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因变异率的线性回归方程是  $y=0.0025x-5.0481$ , 其中,  $x$  轴为年份,  $y$  轴为变异率, 则回归方程的斜率代表变异率变化的快慢程度, 1996–2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率为 0.0025。

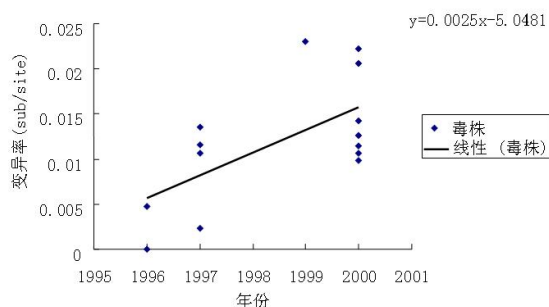


图 2 1996–2000 年的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株 HA 基因的线性回归分析 如图 3 所示, 2000–2007 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因变异率的线性回归方程是  $y=0.0052x-10.309$ , 其中,  $x$  轴为年份,  $y$  轴为变异率, 则回归方程的斜率代表变异率变化的快慢程度。2000–2007

年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率为 0.0052。由于 2000-2007 年的样本量较多, 其相关系数 R<sup>2</sup>=0.7332, 回归曲线更可靠, 所以将回归反向延伸至与 x 轴相交, 其交点恰好位于 1996-1997 年之间, 这个结果表明 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的最初源头的时间应该是在 1996-1997 之间, 这个分子水平的分析结果也较符合现实报道情况。

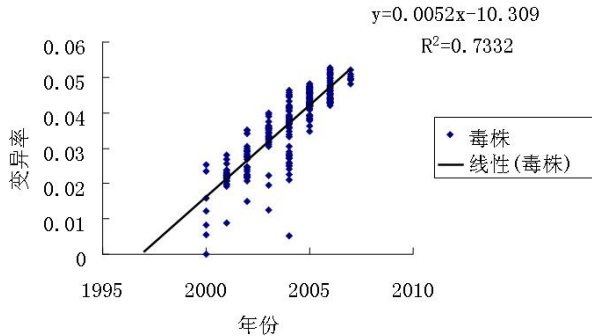


图 3 2000-2007 年 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因的线性回归分析  
结合图 2 和图 3 分析, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率分别为 0.0025 和 0.0052, 这说明 2000 年后的 HA 基因代表变异率变化的速度是 2000 年之前的两倍多。这意味着有某种因素在加快着 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因的变异。

**3.3 NA 基因的进化树分析** 由图 4 所示, 1996-2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因在时间和地点上没有明显的分群。

2000-2007 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因没有时间和地点上很明显的分群, 但是随着时间的推移进化树的分支不断增多, 这说明 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因的变异速度在变快, 而且从地点分布来看, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株已经在此期间分布到多个地区, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的宿主也呈现多种, 除了水禽和鸡外还包括多种的野生禽鸟。

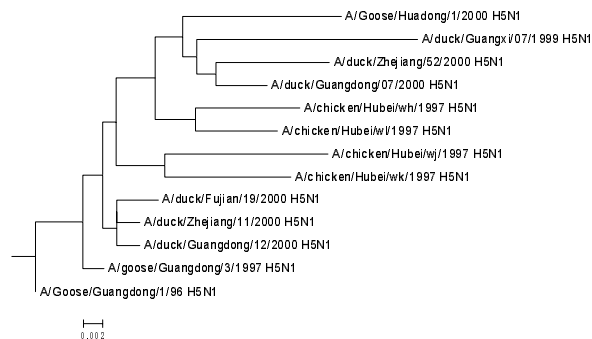


图 4 1996-2000 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因进化树形态

**3.4 NA 基因的线性回归分析** 如图 5 所示, 1996-2000 年间 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因变异率的线性回归方程是  $y=0.0012x-2.3412$ , 其中, x 轴为年份, y 轴为变异率, 则回归方程的斜率代表变异率变化的快慢程度。1996-2000 年间 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因代表变异率变化快慢程度的斜率为 0.0012。

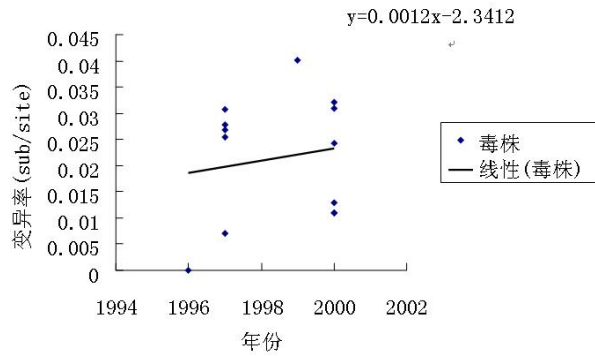


图 5 1996-2000 年间 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株 NA 基因的线性回归分析  
如图 6 所示, 2000-2007 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因变异率的线性回归方程是  $y=0.0033x-6.6624$ , 其中, x 轴为年份, y 轴为变异率, 则回归方程的斜率代表变异率变化的快慢程度。2000-2007 年间的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率为 0.0033。由于 2000-2007 年的样本量较多, 回归曲线更可靠, 所以将回归反向延伸至与 x 轴相交, 其交点恰好位于 1995 年, 这个结果表明 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的最初源头的时间应该是在 1995 年, 这个时间比 HA 基因的时间要早, 这个分子水平的分析结果也较符合现实报道情况。

结合图 5 和图 6 分析, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率分别为 0.0012 和 0.0033, 这说明 2000 年后的 NA 基因代表变异率变化的速度约是 2000 年之前的 3 倍。这意味着有某种因素在加快着 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因的变异。

结合图 5 和图 6 分析, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因代表变异率变化的快慢程度的斜率分别为 0.0012 和 0.0033, 这说明 2000 年后的 NA 基因代表变异率变化的速度约是 2000 年之前的 3 倍。这意味着有某种因素在加快着 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 NA 基因的变异。

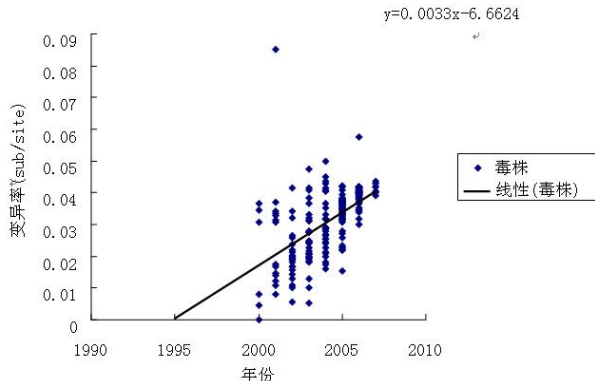


图 6 2000-2007 年间 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株 NA 基因的线性回归分析

## 4 讨论

从分子水平上分析其流行特征, 结果与现实报道的大致相符, 2000 年前后 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 毒株的 HA 基因和 NA 基因变异速度有加快的迹象, 可能意味着由于 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 疫苗大量使用的结果。在免疫压力下 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒出现了新的变化趋势。在免疫压力下 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的 HA 基因和 NA 基因正在发生更快的变化, 而且 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒出现了可感染多种不同宿主的现象, 也是 HA 基因和 NA 基因变化更快的一个结果。因为 HA 基因和 NA 基因编码的对应蛋白质是血凝素和神经氨酸酶, 这些都与受体的结合有关。

本文的结果揭示了 1995–1996 年间很可能是 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒出现的时间点, 从而在分子特征分析的水平上解释了我国第一株广东省鹅源性 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒分离株的分离时间。至于 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒疫苗虽然多年来有效地阻止了 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的大流行, 但是客观上来看, 同时也加快病毒本身变异, 该结果提示东南亚地区在一定的时间间隔后, 必须对目前的 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒疫苗进行更新换代, 才可能避免下一轮 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒的大流行。

### 参考文献:

- [1] Russell CJ, Webster RG. The genesis of a pandemic influenza virus[J]. *Cell*, 2005, (123):368–371.
- [2] Xu X, Subbarao, Cox NJ, et al. Genetic characterization of the pathogenic influenza/Goose/Guangdong/1/96 (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong[J]. *Virology*, 1999, (261):15–19.
- [3] Cauthen AN, Swayne DE, Schultz-Cherry S, et al. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> outbreak in poultry and humans[J]. *J Virol*, 2000, (74):6592–6599.
- [4] Lu JH, Zhang DM, Wang GL. Highlight the significance of genetic evolution of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian flu[J]. *Chin Med J*, 2006, (119):1458–1464.
- [5] Update of avian influenza in animals. Geneva: World Health Organization, 2007. (Accessed at [http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A\\_AI-Asia.htm](http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm))
- [6] Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H<sub>7</sub>N<sub>7</sub> avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands[J]. *Lancet*, 2004, (363):587–593.
- [7] Chen WS, Ni HZ, Huang P, et al. Surveillance of influenza viruses in Guangdong Province, China in 1998: a preliminary report[C]. *Inter Conser*, 2001, (1219):123–129.
- [8] Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2007 influenza season. Geneva: World Health Organization, 2007. (Accessed at <http://www.who.int/entity/csr/disease/influenza/recommendationfinal.pdf>).
- [9] Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>) reported to WHO. Geneva: World Health Organization, 2006. (Accessed at [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/index.html))
- [10] WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva: World Health Organization, 2002. (Accessed at <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs2002.5.pdf>)
- [11] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *Am J Hyg*, 1938, (27):493–497.
- [12] Lu J, Guo Z, Pan X, et al. Passive immunotherapy for influenza A H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus infection with equine hyperimmune globulin F(ab')<sub>2</sub> in mice[J]. *Respir Res*, 2006, (7):43.
- [13] Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2007 influenza season. Geneva: World Health Organization, 2006. (Accessed at <http://www.who.int/entity/csr/disease/influenza/recommendationfinal.pdf>)
- [14] Avian influenza (“bird flu”)—Fact sheet. Geneva: World Health Organization, 2006. (Accessed at [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html))
- [15] Tang XY, Tian GB, Zhao CH, et al. Isolation and characterization of prevalent strains of avian influenza viruses in China[J]. *J Animal Poultry Infect Dis (Chin)*, 1998, (20):1–5.
- [16] Ninomiya A, Takada A, Okazaki K, et al. Seroepidemiological evidence of avian H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, and H<sub>9</sub> influenza A virus transmission to pigs in southeastern China[J]. *Vet Microbiol*, 2002, (88):107–114.
- [17] Guo Y, Li J, Cheng X. Discovery of men infected by avian influenza A (H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>) virus[J]. *Chin J Exp Clin Virol (Chin)*, 1999, (13):105–108.
- [18] Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. Avian-to-human transmission of H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> subtype influenza A viruses: relationship between H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> and H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> human isolates[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, (97):9654–96.

## 猪瘟疫病毒 RT-LAMP 实验诊断初报

曾小娜<sup>1</sup>, 刘中勇<sup>2</sup>, 朱道中<sup>2</sup>, 房红莹<sup>1</sup>, 蒋启荣<sup>3</sup>, 罗满林<sup>1\*</sup>, 刘镇明<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623; 3. 广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:** 为了探索猪瘟疫病毒诊断的新方法, 本研究采用环介导等温扩增法 (RT-LAMP) 与 RT-PCR 方法分别对随即采样的 80 份猪瘟疫疑似病料进行猪瘟疫病毒实验室诊断及对比研究。结果表明 RT-LAMP 与 RT-PCR 检测得出的阳性率分别为 38.75% 和 36.25%。RT-LAMP 检测方法更加灵敏、特异、快速, 可用于检测猪瘟疫病毒, 在等温条件下进行, 不需要复杂的仪器, 操作简单, 整个扩增反应可在 1h 内完成, 为临床检测猪瘟疫病毒提供了一个快速简便的分子生物学方法。

**关键词:** 猪瘟疫病毒; 环介导等温扩增技术; 诊断

**中图分类号:** S854.4<sup>+</sup>2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0038-03

## Laboratory detection of CSFV using the method of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification

Zeng xiao-na<sup>1</sup>, Liu Zhongyong<sup>2</sup>, Zhu Daozhong<sup>2</sup>, Fang Hongying<sup>1</sup>, Jiang Qirong<sup>3</sup>, Luo Manlin<sup>1</sup>, Liu Zhenming<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Quarantine Inspection Institute, Guangzhou 510623, China; 3. Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** In order to explore new ways of diagnosis of classical swine fever virus, the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method and RT-PCR method had been built and used for the detection of CSFV. Eighty materials suspected to have been infected by CSFV were detected by the methods of RT-LAMP and RT-PCR. The results showed that the positive rate using the RT-LAMP method was 38.75% and that using the RT-PCR method was 36.25%. RT-LAMP method for CSFV was more sensitive, specific and rapid than RT-PCR method. It could be done under isothermal conditions without requiring sophisticated equipment. The whole procedure is very simple and rapid. The amplification could be completed in less than one hour. So RT-LAMP was a simple and rapid method for clinical sample's detection of CSFV.

**Key words:** CSFV; reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP); diagnosis

猪瘟疫 (Hog cholera, HC 或 Swine fever, SF) 在欧洲称为古典猪瘟疫 (Classical swine fever, CSF), 是由猪瘟疫病毒 (HCV 或 CSFV) 引起的一种高度接触性传染病。猪是该病毒唯一的自然宿主。由于 CSFV 不同毒株的毒力差异很大, CSFV 感染猪的临床症状和病理变化差别很大, 一般很难根据临床表现和病理变化来确诊<sup>[1]</sup>。猪瘟疫的病原学检测方法包括病毒分离和分子生物学检测。病毒分离法所需的时间较长, 一般在 16 h 以上, 并且实验室对细胞培养要求较高、步骤比较繁琐, 不适于作为常规诊断。分子生物学检测方法包括最常规的 PCR 检测技术、Real-time PCR 检测技术和基因芯片检测技术等。但是, 所有的检测病原的分子生物学方法均需要特殊的仪器, 如 PCR 扩增仪或 Real-time PCR 扩增

仪, 这些仪器费用昂贵, 操作比较复杂, 无法满足基层和现场检测的需求<sup>[2]</sup>。本试验首次采用一种新的扩增方法, 即环介导等温扩增法 (RT-LAMP), 与 RT-PCR 方法对猪瘟疫疑似病例进行对比诊断。RT-LAMP 检测方法更为灵敏、方便、快速, 为基层兽医部门的疫病普查, 提供了良好的途径<sup>[5-7]</sup>。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集** 猪瘟疫兔化弱毒疫苗购自广东永顺生物制药有限公司; 猪瘟疫临床病料由广东省动物防疫监督总所及华南农业大学兽医学院传染病实验室采集并鉴定。

**1.1.2 引物和探针的设计与合成** 参考 GenBank 中发表的基因组序列, 应用 DNASTar 6.0 和 Pre-

mier5.0 软件,根据 LAMP 引物设计的原则,用在线 Primer Explorer 3.0 软件对 CSFV 的保守区域筛选通用的 4 对特异性引物。同时参考已发表的 CSFV RT-PCR 通用引物 A1/A2。引物序列见另文。

## 1.2 方法

**1.2.1 病料的处理** 取 1g 病料,加少量灭菌 PBS (含双抗 1 000 U/mL),用灭菌研磨器充分研磨至糊状,再用 PBS 按 1:10 的体积比稀释成乳剂,反复冻融 3 次,4℃ 8 000 rpm,离心 15 min,取上清,-80℃ 保存备用。

**1.2.2 总 RNA 的提取** 采用 TRIZOL 试剂,按照组织病毒提取说明书进行,-80℃ 保存备用。

**1.2.3 RT-PCR 检测** 采用检测引物 A1/A2 对疑似病料进行 RT-PCR 检测。反转录体系为 20 μL,各组份为:RNA 模板 12 μL、10×RT PCR Buffer 4 μL、dNTPs (10mM) 2 μL、RNase Inhibitor (20U/μL) 0.5 μL、下游引物 (20pmol/μL) 0.5 μL、AMV (5U/μL) 1 μL。将各组分轻轻混匀,室温放置 10min,42℃ 水浴 1h,冰上冷却 2 min,反应产物直接 PCR 扩增或 -20℃ 保存。PCR 反应体系为 50.0 μL,各组份为:10×Ex Taq Buffer 5.0 μL、dNTPs (2.0mM) 5.0 μL、引物 A1/A2 (20pmol/μL) 各 2.5 μL、cDNA 4.0 μL、EX Taq 酶 (5U/μL) 0.25 μL、ddH<sub>2</sub>O 30.75 μL。将 PCR 各组分加入离心管中瞬时离心混匀,在 PCR 仪上执行以下程序:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s;55℃ 退火 30s;72℃ 延伸 1min,共运行 30 个循环;72℃ 末次延伸 10min。同时设不加模板的阴性对照。反应结束后取 5 μL PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳 (0.5 μg/mL EB) 检测扩增的结果。

**1.2.4 RT-LAMP 检测** 采用 RT-LAMP 引物 BIP/FIP/B3/F3 对疑似病料进行 RT-LAMP 检测。猪瘟病毒 RT-LAMP 的反应体系为 25 μL,各组份的终浓度为:F3 和 B3 各 0.2 μM、FIP 和 BIP 各 1.6 μM、dNTPs (2.5 mmol/L) 3.5 μL、Betaine 1 mM、10×Bst Buffer 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> 8mM、Bst DNA 聚合酶 8 U、反转录酶 5 U、模板 2 μL,加 DEPC 水至 25 μL。将水浴锅调至温度 63.5℃ 后,将含 RT-LAMP 反应液的 PCR 反应管充分混匀置于水浴锅内等温扩增 1 h,80℃ 灭活 10 min,4℃ 终止。

### 1.2.5 RT-LAMP 产物的检测

**1.2.5.1 染色肉眼检测** 通过向扩增产物中加入 1 μL SYBR GREEN I,观察颜色变化判断扩增与

否。在自然光下扩增产物颜色由橙色变为黄绿色为阳性反应;不变色为阴性反应。

**1.2.5.2 RT-LAMP 产物的特异性电泳检测** 反应结束后,取 3 μL RT-LAMP 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 检测结果** 反应结束后取 5 μL PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳 (0.5 μg/mL EB) 检测扩增的结果。鉴定所扩增的目的片段长为 508 bp,与预期片段大小一致,见图 1。

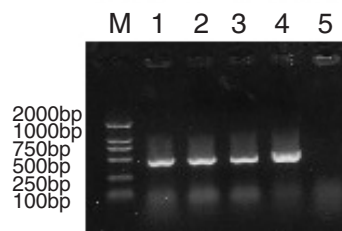


图 1 RT-PCR 对 CSFV 检测结果

M: DNA 分子质量标准;1: 阳性对照;2~4: CSFV 毒株;5: 阴性对照

**2.2 染色肉眼检测** 向扩增产物中加入 1 μL SYBR GREEN I,阳性样品扩增产物与染料混合后颜色由橙色变为绿色,而阴性样品扩增产物仍为橙色,见图 2。

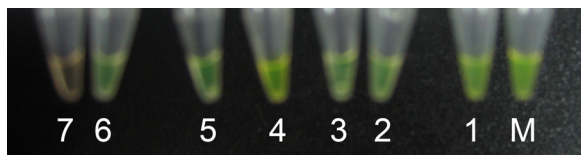


图 2 RT-LAMP 对 CSFV 染色肉眼检测结果

M: 阳性对照;1~6: 阳性扩增产物;7: 阴性对照

**2.3 RT-LAMP 电泳检测结果** 对各个猪瘟病毒样品进行特异性扩增反应,结果可见阳性样品扩增产物均有梯形条带的产生,而空白对照无任何条带,见图 3。

**2.4 RT-LAMP 与 RT-PCR 检测结果对比** 对各个疑似猪瘟病料分别进行 RT-PCR 检测和 RT-LAMP 检测,其结果表明二者之间的诊断存在差异,诊断结果阳性率对比详见表 1。

## 3 讨论

本次实验研究,首次采用 RT-PCR 及 RT-LAMP 检测实验技术对 80 份猪瘟疑似病例进行实验室诊断。结果显示 RT-PCR 及 RT-LAMP 检测方法得出的阳性率分别为 36.25% 和 38.75%。RT-LAMP 检测方法操作简便,结果判断便捷,在等温条件下进行

扩增靶序列,不需要复杂的仪器设备,其成本低,为临床检测提供了一个快速简便的新方法,十分适合于临床应用和疫情普查。

扩增反应中外引物 F3 和 B3 开始启动扩增反应,内引物(FIP 和 BIP)连接目的 DNA 片段,形成茎环结构。由于这种茎环结构的形成具有随机性,随着循环反应,茎的长度和环的个数都逐渐增加,

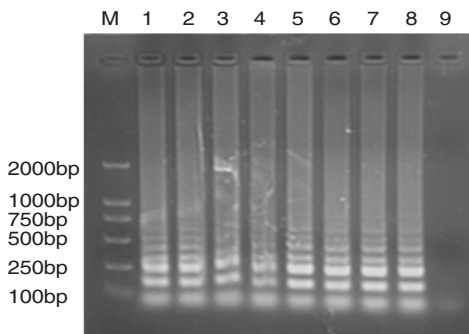


图 3 RT-LAMP 对 CSFV 的特异性检测电泳图

M: DNA 分子质量标准; 1: 阳性对照; 2~8: CSFV 毒株; 9: 阴性对照

表 1 RT-LAMP 与 RT-PCR 检测结果对比

样品来源	检测份数	RT-PCR检测阳性数	RT-LAMP检测阳性数
广州	21	8	9
佛山	6	4	4
四会	17	6	6
东莞	8	2	2
博罗	10	4	5
云浮	4	1	1
鹤山	4	1	1
中山	2	0	0
阳江	2	1	1
江门	2	1	1
肇庆	3	1	1
茂名	1	0	0
合计	80	29	31
阳性百分率		36.25%	38.75%

(上接第 30 页)

**5.2.3 建立产销联建制度** 产区和销区的动物防疫部门联手合作,建立信息互动,从源头上确保肉食品安全。通过对产地地域、生产规模、生产环境、防疫检疫、投入品使用以及药物检测等方面的评价,确定安全优质的畜禽场作为定点供应基地。东莞市 2006 年 6 月出台了《东莞市保障生猪稳定供应和质量安全实施方案》,陆续认定了 110 多家供莞生猪定点基地,2009 年 1 月 1 日起全市生猪批发商必须从基地采购生猪,凭“两证一标”和供莞

最后的产物为茎环组成的混合物,即含有若干倍茎长度的茎环结构。所以扩增产物的碱基长度具有连续性,在凝胶成像时,呈现梯形条带<sup>[3]</sup>。据报道有研究表明 RT-LAMP 方法敏感性比 RT-PCR 方法强,其灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。但是 RT-LAMP 检测技术是否存在非特异性扩增,在不同实验条件下假阳性率如何,还有待进一步探讨。

在猪瘟病毒的诊断过程中,我国现阶段面临的情况是基层兽医机构由于缺乏仪器无法开展检测,而能进行辨别与收集的研究机构则接触病畜的机会又较少。RT-LAMP 诊断方法的推广和发展,将为猪瘟病毒在分子生物学水平的诊断和研究上提供有力手段,为疫病的早期诊断和病原学普查提供了可能。该方法因而具有较广阔的应用前景<sup>[4]</sup>。

**参考文献:**

[1] 孟晓芹, 郑明. 国内猪瘟研究概况[J]. 中国兽药杂志, 1992, 9(3): 56258.  
 [2] 蒋晓颖, 俞秋兰, 钱丽英. 当前猪瘟流行病学研究进展. 动物科学与动物医学, 2002, 2(19): 29  
 [3] 肖斌, 朱永红, 邹全明. 简便敏感的环介导等温扩增基因诊断新技术[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(7): 761-763.  
 [4] 杨帆, 王振宝, 王常汉, 巴音查汗. 骆驼伊氏锥虫病实验诊断初报. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(3): 23225.  
 [5] Notomiti, Okayamah, Masubuchih, etal. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63.  
 [6] JP Dukes, DPKing, Salexandersen. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. Arch Virol, 2006, 151:1093-1106.  
 [7] Moriy, Nagaminek, Tomitan, etal. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magne-siumpyrophos phate formation [J]. Biochem Biophys Rescommun, 2001, 289:150-154.

标识进入屠宰场,使生猪的来源及质量得到保障。

**参考文献:**

[1] 吴景时. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.  
 [2] 林荣泉. 瘦肉精由来及对人的危害与防治对策[J]. 山东食品科技, 2002, (9): 1-2.  
 [3] 刘琴, 谢宏, 周亚平. 生猪“瘦肉精”残留现状分析及对策[J]. 饲料广角, 2005, (13): 19-20.  
 [4] 弓巧玲, 李永香, 邵声波. 生猪体内盐酸克伦特罗残留情况的调查研究及控制措施[J]. 肉品卫生, 2005, 23(1): 24-25.  
 [5] 林荣泉. 关于“瘦肉精”系列问题的综合探讨[J]. 肉类工业, 2006, (9): 49-51.



# 氯芬黄敏片引起犬的胃损伤的临床及组织学观察

庄瑞宏, 吴仲恒, 高 然, 陈义洲, 詹耀明\*

(华南农业大学, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为了研究和观察犬口服氯芬黄敏片后的反应并初步探讨其诊断方法, 本次实验对广州本地土狗喂服氯芬黄敏片, 对犬进行了一系列的临床检查, 包括X线诊断及探讨胃部病理学变化。结果表明: 喂服了氯芬黄敏片的犬的胃部会出现不同程度的病变, 甚至穿孔死亡。所以临床上应尽量避免使用含非甾体类成分的药物如氯芬黄敏片等进行治疗, 对必需使用该类药物进行治疗的犬, 应密切观察其临床症状, 尽量避免出现严重的胃部损伤。

**关键词:** 非甾体类解热镇痛药物; 胃溃疡; 胃穿孔; 造影

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2009)04-0041-02

氯芬黄敏片(曾用名感冒通)是一种人用的常见复方感冒药, 其中含双氯芬酸钠属于非甾体类解热镇痛药物(NSAIDs), 且为其中作用较强的一种, 它对前列腺素合成的抑制作用强于同类药物阿司匹林和消炎痛。NSAIDs的药理作用机制主要是通过抑制环氧化酶, 减少炎性介质前列腺素的生成, 从而产生抗炎、镇痛、解热的作用。而药物对前列腺素的抑制, 会破坏机体的消化道的保护屏障, 故人服用该药后可能会出现胃不适, 烧灼感等症状。Narita等(2006)认为, NSAIDs抑制了前列腺素的分泌, 从而进一步影响胃肠节律和胃动素。而前列腺素的生物效应又包括: 抑制胃酸和胃蛋白酶的分泌从而保护胃壁粘膜, 刺激碳酸氢盐和粘液的分泌。感冒通中的双氯芬酸钠正是通过抑制前列腺素合成而导致胃黏膜损伤, 在宠物临床, 时常会出现主人给狗喂服感冒通或宠物误食感冒通片而导致胃出血甚至胃穿孔的病例。为研究和观察犬口服感冒通片后的反应并初步探讨其诊断方法而进行了本次实验。

## 1 实验动物和方法

**1.1 实验动物** 实验动物为12只4到6月龄健康广州本地土狗, 体重有2.5 kg到10 kg之间, 饲以法国皇家牌子的幼犬狗粮, 一日两餐, 正常饮水。随机分成对照组与实验组, 每组各6只犬。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组** 实验组的犬之中, 体重在2.5

kg到3 kg为一组(分别为A、B、C犬, 共三只), 按1/4粒每次, 每天两次的剂量, 在喂食后1~2 h内口服感冒通片剂(每片含双氯芬酸钠15 mg)。体重从7.5 kg到10 kg为一组(分别为D、E、F犬, 共三只), 则按1粒每次, 每天两次的剂量, 在喂食后1~2 h内口服感冒通。

**1.2.2 实验处理** 观察实验犬的临床症状和生命体征的变化。在喂药后第3、第6日分别对犬进行X线钡餐造影检查, 对第7日后出现呕吐拉稀严重, 有黑粪, 精神状态差等临床症状明显的或在第7日前就已经死亡的犬进行胃切开手术, 并分别取胃的病变部位及正常组织, 用bouin固定液固定并进行病理组织学检查, 以评价药物引起胃损伤的程度。对照组不喂药, 喂食饮水与实验组相同, 第7日进行胃切开观察。

## 2 实验结果

**2.1 临床检查结果** 实验组的犬在喂药后7天内出现的症状情况如表1所示。对照组犬和未死亡犬在第8天进行剖解观察作对比。A犬胃体广泛出血、病变明显、胃幽门穿孔较为典型, 如图1、2所示。D、E犬出现典型胃溃疡症状, 如图3所示。F犬的胃溃疡症状如图4所示。B犬未出现临床症状, 如图5所示。对照组的犬均无呕吐、拉稀、黑便、胃溃疡、出血、穿孔等症状。精神状态, 饮食欲正常。于第8天进行剖解取样对照, 观察显示胃部完好。

**2.2 X线检查结果** D犬没进行x检查就已经死

亡, 其他所有的实验犬的 X 光片均出现不同程度的胃部鼓气现象, X 线表现不良, 难以发现典型的胃溃疡征。

**2.3 病理组织学检查** 病理组织学检查发现, 实验组的犬胃壁的黏膜层均出现不同程度黏膜损伤, 黏膜缺失深达黏膜下层。黏膜上皮发生自溶, 3 只犬胃部的损伤达到肌层, 如图 4 所示。4 只犬都有不同程度的黏膜下层淤血, 如图 2 所示。A 犬出现胃穿孔, 穿孔处在胃与十二指肠交界部位。胃粘膜损伤, 缺失深达肌层, 如图 6 所示。部分肠上皮细胞变性坏死。

### 3 讨论

本实验结果显示, 实验犬口服小剂量的感冒

通片后可在短期内出现临床症状, 初期主要症状表现为呕吐, 食欲下降。随着用药时间的延长, 实验犬的消化道症状逐渐明显, 出现更为频繁的呕吐、食欲废绝、排煤焦油样血便, 解剖发现胃溃疡和胃穿孔的病变。

本实验中, 喂服感冒通的犬只, 除一只没有明显症状外, 其他都出现了不同程度的呕吐和食欲下降。出现症状的比率达到 80%, 这说明了即使是服用少剂量的感冒通片, 也会引起犬胃损伤。本实验的大体解剖和胃病理切片检查的结果同样证明了实验犬的胃受到了严重的损伤。因此在临床上应尽量避免给犬使用感冒通等使用含非甾体类成分的药物来治疗犬的呼吸道病。

表 1 实验组犬喂药后 7 天内出现的症状情况

犬号	呕吐	拉稀	拉黑血便	胃出血点	胃溃疡	胃穿孔	死亡时间
A犬	+	+	-	+	+	+	第 7 天
B犬	-	-	-	-	-	-	第 7 天剖解
C犬	+	+	-	-	-	-	第 7 天剖解
D犬	+	+	+	+	+	-	第 3 天
E犬	+	+	+	+	+	-	第 5 天
F犬	+	+	+	+	+	-	第 7 天
总计(只)	5	5	3	4	4	1	-

注: “+”代表有此症状, “-”代表无此症状, 胃穿孔图像如图 1 所示。

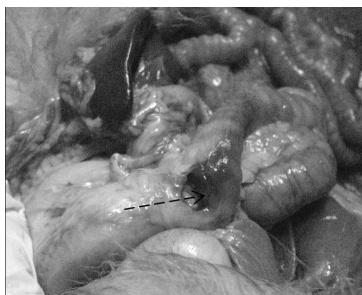


图 1 A 犬胃幽门穿孔



图 2 A 犬胃部病变和出血

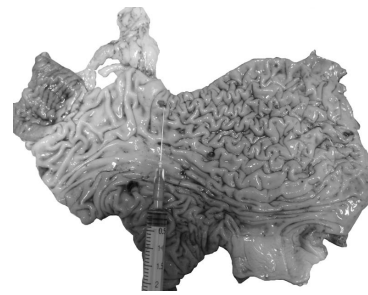


图 3 D 犬胃溃疡(针头所指位置)



图 4 F 犬胃溃疡(针头所指位置)



图 5 喂药后第 6 天 X 光片(背腹位片)

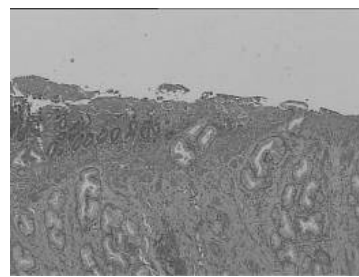


图 6 A 犬胃病理切片

# 一例犬胸壁透创的救治报告

毛天翔<sup>1,2</sup>, 张忠传<sup>1</sup>, 施玲玲<sup>1</sup>, 黄钱君<sup>1</sup>, 沈妮娜<sup>1</sup>

(1. 余姚市禽畜病防治研究所, 浙江 余姚 315400; 2. 余姚市畜牧兽医局, 浙江 余姚 315400)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0043-01

犬胸壁透创通常发生于机动车撞伤、其他动物咬伤、人为的刺伤或枪伤等。由于胸膜腔开放, 空气随创口自由出入, 患侧胸膜腔负压消失, 从而形成外伤性气胸。该病在临床上较为少见, 一旦发生后就属于急诊病例, 对医院的急救设备及医护人员的急救技术和经验都有较高要求。现报告我院对一例犬胸壁透创的成功救治过程和体会, 供同行参考。

## 1 病例介绍

一雄性“米格鲁”猎犬, 3岁, 体重14 kg, 体格健壮, 狩猎史两年。救治前40 min, 其左侧胸壁被野猪獠牙挑开, 创口长15 cm。因创口被左侧肺叶堵住, 且畜主覆盖灭菌纱布一块, 故气胸症状并不严重。临床检查: 体温38.3℃, 呼吸频率35次/min, 心率165次/min, 可视黏膜粉红, 生命体征基本正常。X光平片检查: 病犬左胸第8、9肋骨发生骨折。

## 2 手术治疗

病犬常规麻醉, 右侧卧保定。除去覆盖于创口处的纱布, 将一块用生理盐水浸湿的灭菌纱布轻置于创内肺叶与胸壁之间, 另取中间涂以红霉素软膏的两块灭菌纱布, 置于创内肌层与皮肤之间。然后除去创围被毛, 用聚维酮碘消毒和75%酒精脱碘。取出皮下的两层纱布, 修整创缘皮肤, 再除去肺叶表面的纱布, 并仔细检查肺叶损伤程度。用庆大霉素水针剂冲洗肺叶表面, 用纱布吸干后, 将突出的肺叶推入胸腔, 立即在创口处贴上外科手术薄膜。

开始缝合时划开薄膜, 病犬出现因气胸引起的呼吸困难, 立即给予病犬氧气急救, 以缓解缺氧症状; 此外在监护其生命体征的同时, 加快手术缝合速度。缝合创口前在其上方预置剪去针头的细输液胶管, 以备抽取胸腔气体之用。对肋间肌层采用结节缝合, 缝合时注意观察肺叶萎陷程度, 并将发生骨折的肋骨四个断端进行对合。第一层缝合完成后, 有3处出现捻发音。以捻发音位置为起

点, 采用多重缝合法严密缝合肌层。待肌层闭合完成, 开始抽取胸腔内气体, 抽气至750 mL时, 见犬呼吸开始平稳。完成皮肤缝合后, 继续抽取胸腔内气体, 当抽气至1 000 mL时感到抽气费力。此时停止抽气, 拔除抽气细胶管, 缝合抽气孔。创部装结系绷带, 另给病犬穿自制纱布背心。

## 3 术后护理

术后对病犬主要采取营养支持、抗感染疗法, 一周内给予犬用白蛋白、抗应激药物、抗菌药物等, 每两天检查创口和更换创口纱布。同时要求主人保持病犬术后静养。术后14天拆线, 创口愈合良好。40天后回访, 该犬已能轻松进行跳跃活动。

## 4 治疗体会

**4.1 减轻气胸症状** 该犬发生胸壁透创后, 因左肺叶恰好堵住创口, 且犬主也在病犬创部及时覆盖了一块灭菌纱布, 对减轻病犬的气胸症状起到很好的作用, 也为送院急救治疗争取了宝贵的时间。所以, 在将发生胸壁透创的病犬送院治疗前, 应采取有效方法堵住胸壁创口, 防止严重气胸导致死亡。

**4.2 及时正压输氧** 动物发生气胸后, 有条件的应立即采取间歇正压通气(IPPV)方案进行救治, 延长犬的存活时间。通过采取止痛、供氧、镇静等急救措施, 能够有效地缓解呼吸困难, 降低死亡率。

**4.3 恢复胸腔负压** 缝合胸壁时采用了多重缝合法, 将胸壁缝合严密; 然后抽出胸腔内气体, 尽快恢复胸腔负压, 是成功救治的关键步骤。在创口处装结系绷带, 给病犬穿纱布背心, 既避免了外界空气再次进入胸膜腔, 也有利于创口愈合。

**4.4 预防创口感染** 创伤发生后及时在创口覆盖灭菌纱布、缝合前创部除毛时再次用无菌纱布细致覆盖创口、手术中严格执行无菌操作和术后创部护理及全身营养支持、抗感染疗法等, 都对有效地防止创口感染起到重要的作用。

# 犬的疫苗与接种问题

郭淑萍

(深圳市盐田区动物卫生监督所, 广东 深圳 518081)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0044-01

免疫接种是指应用疫苗、菌苗、类毒苗、免疫血清等生物制剂, 激发动物机体产生特异性抵抗力, 使易感动物转化为非易感动物。临床上根据接种时间不同, 分为预防性接种和紧急性接种。在经常发生传染病的地区或受传染威胁的地区, 平时有计划地给健康动物免疫接种, 或在动物输入输出时的计划外免疫接种, 称为预防性接种。在发生传染病时, 为了迅速控制和扑灭疾病的流行, 对疫区和受威胁区尚未发病的动物进行应急性免疫接种, 称为紧急性接种。紧急接种的目的是建立免疫带, 包围疫区, 就地扑灭疫情。当前接种狂犬病疫苗是养犬法规规定的内容, 既对犬只有益, 也有利于人类健康。目前, 国内大城市中的狂犬病发病率低, 主要与给犬接种狂犬病疫苗有很大关系。下面结合工作实际, 就犬疫苗接种的若干问题进行阐述:

## 1 常用的犬疫苗种类

目前使用的犬疫苗可分为国产、进口两大类。

**1.1 国产疫苗** 主要有犬五联苗、犬六联苗、犬七联苗、犬九联苗、狂犬病疫苗单苗等。如犬五联苗用于预防犬瘟热、犬细小病毒病、犬传染性肝炎、犬副流感和狂犬病。犬七联苗用于预防犬瘟热、犬细小病毒病、犬副流感、犬传染性肝炎、狂犬病、犬传染性脑炎、冠状病毒性肠炎。值得注意的是, 预防狂犬病最好选择单苗接种, 以确保免疫效果。

**1.2 进口疫苗** 主要有英特威公司小犬二联苗、犬四联苗、犬咳活疫苗、狂犬苗等; 梅里亚公司犬六联苗、狂犬苗; 辉瑞公司犬五联苗等。如英特威公司小犬二联苗可预防犬瘟热、犬细小病毒病; 犬四联苗除预防犬瘟热、犬细小病毒病外, 可预防腺病毒 1 型(传染性肝炎)、2 型(传染性气管支气管炎)、犬副流感。梅里亚公司犬六联苗除含有上述犬四联苗的弱毒外, 还包括灭活的两种血清型钩端螺旋体, 从而能预防犬常见的钩端螺旋体病。

## 2 常用犬疫苗的使用

**2.1 幼犬 50 日龄后, 即可接种犬疫苗。** 如果选择进口四联或六联苗, 则需连续接种 3 次, 每次间隔 3~4 周; 如 3 月龄以上犬, 则需连续接种 2 次, 间隔时间相同。最后一次接种时, 增加 1 次狂犬苗注射。

此后, 每年接种 1 次, 以强化免疫效果。如果选择国产五联苗, 幼犬从断奶之日起(出生后约 45 天断奶)应连续注射疫苗 3 次, 每次间隔 2 周。此后, 最好每半年再接种 1 次。

**2.2 使用疫苗时, 每头份一般用注射用水 2 mL 稀释, 然后行肌肉或皮下注射。**

## 3 犬接种疫苗后的反应

接种疫苗后, 犬一般不会出现大的身体变化。个别犬在接种疫苗后第 2 天, 可能出现不愿活动、食欲减退等异常, 但不久即会恢复正常。如果犬接种疫苗 10~20 min 后出现皮疹, 面部肿胀, 甚至浑身无力等, 则属于过敏现象, 应该请兽医立即抢救。临床上使用英特威疫苗极少出现不良反应, 但为安全起见, 给犬接种任何疫苗后, 应让主人停留 10 min 以上进行观察, 待幼犬无任何异常后再离开。如果犬接种疫苗后 7 天左右发生传染病, 可能是接种时幼犬已处于传染病潜伏期, 或者在此期间感染了疾病, 应该立即接受相应的治疗。

## 4 接种疫苗对犬的保护

犬接种疫苗次数完成后, 才能获得一定程度的保护, 而非 100% 的保护。其原因涉及以下几个方面: 第一, 与疫苗种类有关。不同种类的疫苗可预防的疾病不同, 因此接种了某种疫苗的犬完全可能感染疫苗未能预防的其他传染病。第二, 与疫苗质量有关。进口疫苗的保护力强于国产疫苗, 如对犬瘟热病毒的防范方面, 国产疫苗存在着不足。第三, 全程接种未完成的幼犬, 在与重危病犬

(下转第 48 页)

# 山羊养殖须把好“五关”

周志可, 谭武强

(新丰县畜牧兽医水产局, 广东 新丰 511100)

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0045-02

山羊是一种较容易饲养管理的草食动物,食性杂,能吃各种精、粗饲料,特别喜欢吃各种树叶和嫩枝,适应性、抗病力强。饲养山羊投资少、见效快,小羊出生后7-8个月就可以配种,怀孕期148天,年产两胎,每胎2~3只,平均出栏时肉重可达20~40 kg。一头山羊可以获得纯利200多元,一年一只母羊可以获得几百元的毛利。

新丰县位于广东省中部偏北,属粤北山区县,全县总面积2015.2 km<sup>2</sup>,其中山地面积1698.9 km<sup>2</sup>,素有“九山半水半分田”之称。利用山区山地草场丰富的自然资源优势、推广山羊养殖,是增加山区农民收入,优化养殖品种结构、推动养殖产业升级的主要措施之一。笔者认为养好山羊须把握好以下“五关”:

## 1 把好引种选种关

### 1.1 因地制宜引进山羊品种

1.1.1 全面考察引种地的地理位置、饲草饲料、年气温变化等。被引进的山羊品种原产地与引进地区的自然环境条件的差异性越小越好,一般从条件差的地方引入的品种适应性要好。

1.1.2 选择符合市场需要的品种。必须先了解掌握市场信息,根据市场的需求状况选择适销对路的山羊品种。

1.1.3 注意选择生产性能优良的品种。通过查看原种场的生产记录档案以及畜牧兽医部门提供的真实准确资料,结合当地的品种资源和生产实际选择生长快、个体大的品种及其杂交后代。

1.1.4 要根据自己的技术力量和财力,合理确定引羊数量。开始引进的数量不宜过大,通过试养,有经验后才逐步扩大饲养规模。

### 1.2 做好引种前的准备工作

1.2.1 必须考察清楚引种地区的山羊传染病和流行情况,如果当地羊病流行,就不能引种,以免

造成不必要的损失。

1.2.2 建好羊舍以及配套设施,并用10%石灰水或消毒威等进行全面消毒,15天后方可引进羊群。

1.2.3 根据引进羊群的数量及以后的生产计划,事先规划好羊群放牧的场地。

1.2.4 确定好引种日期,最好在早春3-5月或秋季的9-10月份,晴凉天气较好;要做好车辆用具的消毒。并与畜牧兽医部门联系,争取他们的技术支持。尽量避免在炎热的夏天和寒冷的冬天引种。

### 1.3 选择种羊

1.3.1 必须选择健壮、体型好,适应能力强的1~2岁的青年健康羊:眼睛洁净有神,尾部清洁。全身被毛光亮,行动活泼,反应灵敏,鼻孔及鼻镜干净湿润,口腔、眼粘膜呈粉红色。

1.3.2 种公羊要求身躯高大,睾丸成对且匀称,发育好,不能有半辜或隐辜。

1.3.3 肉用羊要具有细致而松弛的体质,骨细短,皮疏松,皮下脂肪和肌肉发达,毛短、体长、四肢细短,性情温驯者为优。

引种时应办理好检疫登记手续,避免长时间长途运输,最好有专业技术人员陪同,天气炎热时最好早晚运输,途中半天以上的要注意给山羊休息、补料和饮水。若羊只出现晕车等应激反应时,要及时处理,每只羊用葡萄糖5~10 g,复合维生素0.5 g,溶于水中灌服。到达目的地后应休息1~2 h后再给予饮水,第一餐喂至六成饱,第二餐才开始让羊吃饱;应隔离2~3周后再合群饲养、放牧。

## 2 把好羊舍建设关

2.1 场地选择 山羊的习性爱干燥、恶潮湿,爱清洁、厌污浊,要求干燥向阳、空气流通的羊舍。因此应选择地势高燥、平坦、宽阔、有清洁丰富的水源、排水方便、向阳通风好的地方,但离交通要道不少于300 m,四周居民较少,要在居民区的下风

头和下水头，最好周围有天然屏障，避免人畜相互污染和干扰。场址面积既要考虑有充足的四季牧场，又要考虑今后羊群发展用地的需要。

**2.2 羊舍面积** 一般以每只公羊 1.2m<sup>2</sup>、母羊 1m<sup>2</sup>、带羔母羊 2m<sup>2</sup>、青年公母羊 0.6m<sup>2</sup>、阉羊 0.6~0.8m<sup>2</sup>计算。

**2.3 栏舍规格** 以吊脚楼羊舍较好，一般吊脚楼屋顶高 4 m，檐高 3 m，门高 2 m、宽 2~2.5 m，窗开在向阳方向、离地 1.5 m、面积为羊舍的 1/15~1/20。舍内羊床离地面 1.0~1.3 m，防潮防球虫。羊床以 (2×3) cm 的直边木条或竹条制成间距 1~1.5cm 的床面，以能落羊粪而不夹脚为宜，可将羊床做成小连块式，便于翻开清理粪便，一般每个羊床为 (1.2~1.5)×1m<sup>2</sup>。大栏按每只羊 0.5~0.7m<sup>2</sup>计算，每栏控制在 10~15 只羊。

此外，还应附设有补料槽、水槽、保暖设备、运动场、药浴池等。运动场在羊舍旁边修建，面积不低于羊舍的 1.5 倍；药浴池一般长 5~10 m，深 1 m，底宽 30~50 cm，上宽 60~100 cm，用水泥和石头砌在舍外。

### 3 把好饲养管理关

**3.1 轮牧放养、适当补料** 草(林)地实行分区轮牧放养，将放牧草地划为若干区块，一个星期放牧一个区块，轮换放牧，达到以草养牧，牧肥养草的目的，掌握好放牧时间：夏秋季上午早放早收牧，下午迟放晚收牧；冬春季上午放牧要适当推迟，下午要适当提早收牧。同时要根据不同羊群的营养需要适当补料，补料要定时、定量、定质，饲草品种尽量多样化，以提高山羊的食欲。山羊的饲料分为粗饲料和精饲料，粗饲料主要有青、干牧草、农作物秸秆和多汁的块根饲料，精饲料主要有谷实类、薯类、糠麸类、饼粕类等。注意羊不能饲喂动物性蛋白饲料。

**3.2 保证羊舍的通风透气** 保持卫生清洁、冬暖夏凉。要调教山羊定点排泄粪便，每天出牧后羊床下的粪尿要及时清除，保持羊床清洁干燥，并经常打扫羊舍内外。

**3.3 合理分群、分栏饲养** 由于种羊、妊娠母羊和羔羊的生产目的不同，对饲草饲料质量和饲养管理的要求也不同。因此，应根据山羊的大小、强弱、公母进行合理分群分栏饲养。

**3.4 掌握适度规模** 饲养规模应由小到大。开始阶段最好饲养 20~30 只种羊，掌握方法技术后再

根据投资能力、市场价格、饲草面积等条件扩大养殖规模。

**3.5 及早补饲，适时断奶** 出生一周左右的羔羊可随母羊一起在附近放牧运动，10 日龄训练采食幼草或用炒熟的黄豆诱导羔羊开饲，15 日龄后要补喂精料(要求蛋白质含量占 18%~20%，粗纤维不超过 6%，并加入 1%食盐)，补料量由少到多(每只羔羊日喂量为：20 日龄 20 g、30 日龄 50 g、40 日龄 100 g)，逐渐减少哺乳次数，在 50~60 日龄断奶。

**3.6 公羔羊适时阉割** 凡不作种用的公羔应在 20 日龄左右去势。一般以结扎法为好，先用酒精消毒，然后用 2 个橡皮圈在阴囊睾丸的上部靠近腹部绕圈，愈紧愈好，约 20~30 天后阴囊睾丸会萎缩、干枯、自然脱落。

**3.7 组建、调教好羊群** 在生产中一定要重视组建好羊群，保持羊群的合理生产结构。通常认为羊群公母比例是 1:36，繁殖母羊、育成羊、羔羊比例应为 5:3:2，但在实际生产中会略有调整。羊群放牧时，选择强健的喜欢在前面吃草的青年母羊或阉公羊训练“领头羊”，建立条件反射，以便于放牧管理，训练时可采取强制和信号相结合的方法。

**3.8 根据季节变化进行管理** 春季病原微生物繁殖较快，必须注意驱虫和疫病防治工作；夏季降雨集中，湿度较大，要特别注意通风、排水、降湿，防止中暑；秋季及时收割采集牧草，晒制青干草，收集农作物秸秆茎叶(花生藤、甘薯藤和稻草等)作青贮或氨化技术处理备用，驱防蚊蝇虫蠓，抓膘，抓秋配；入冬前修补羊舍，种植黑麦草等牧草，备足草料，冬季天气寒冷，采食较困难，早晚应给予补料，同时注意防寒保暖，严防贼风，确保安全过冬。

### 4 把好配种繁殖关

主要是养好母羊，保证母羊年产二胎，无空怀、流产，小羊、羔羊不死亡，生长快。

**4.1 要养好种公羊并定期更换，不能近亲繁殖。** 公、母羊搭配以 1:36 为宜，对种公羊的饲养管理，在非配种期以粗料为主，从配种预备期开始增加精料营养水平及喂量，进入配种期后，混合饲料日喂量应在 0.8~1.2 kg，同时要有足够的运动，经常刷拭羊体，保证其健康无病。

#### 4.2 掌握山羊的性成熟、体成熟及发情周期

**4.2.1 性成熟** 一般在 6~7 月龄(个别早熟品

(下转第 50 页)

# 一起猪链球菌病和伪狂犬病的混合感染的诊治

麦康荣, 林伟明

(深圳市宝安区松岗街道动植物防疫检疫站, 广东 深圳 518105)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0047-02

近年以来,由于市场因素的刺激,生猪的存养量大幅上升,再加上由于流通环节较多,流通非常频繁,流通距离越来越远。这对繁荣经济,增加养殖效益起了重要的推动作用,但也同时给疾病的感染和传播创造了有利条件,给猪病的防治带来了困难。有的猪场感染了传染病后,由于治疗不及时不得法,而造成了惨重的经济损失。2008年7月中旬,我街道一养猪户因盲目从外地购进中猪,发生猪病疫情,引起猪只连续死亡,造成一定的经济损失。根据流行病学、临床症状、剖检变化和实验室诊断,诊断该病为猪链球菌病和猪伪狂犬病混合感染,现报告如下。

## 1 发病情况

我街道一养猪户于2008年6月16日和6月18日分别从广西和广东四会各调进50头中猪,4d后猪只开始发病。该养殖户认为是由于天气炎热及长途运输所致,没有引起足够重视。至6月27日,该养猪户的100头生猪全部发病,死亡11头。

## 2 临床症状

突然发病,精神沉郁、病猪体温高达41℃以上,发抖,运动不协调,痉挛;呕吐,流涎,呼吸加快,叫声嘶哑,腹泻;有的猪倒地侧卧,头向后仰,四肢划动;有的病猪关节肿大、跛行;有的病猪空嚼、磨牙,粪便干燥,有的呈算盘子状,粪便表面常有粘液。还有两头无任何症状即突然死亡。病猪耳部、胸部、腹部出现紫斑。

## 3 剖检变化

死猪皮肤上有紫斑,尸僵不全,血液凝固不良。脑膜充血出血、水肿,脑脊髓液增多。上呼吸道粘膜及扁桃体出血、水肿,肺水肿,胃肠粘膜可见卡他性炎症,胃底部有明显出血区。肝肾有特征性坏死灶,中央灰白色,外周有红色晕圈。全身淋巴结肿大,切面充血、出血。关节部皮下胶胨样水肿,

水肿液为淡黄色。开关节切囊有乳酪样物,关节滑液变浊,关节滑膜充血。

## 4 实验室诊断

采取了6头病猪的血液和病料,送广东佛山科学技术学院预防兽医实验室进行病原分离及检测。

**4.1 镜检** 取病猪心血涂片,革兰氏染色镜检,可见大量单个、成双或少量呈短链状排列的革兰氏阳性球菌,菌体周围有荚膜。

**4.2 细菌分离培养** 无菌采集病猪关节液、关节囊肿物病料,分别划线接种于pH值为7.6的血液琼脂培养基和普通培养基中,置37℃培养24h观察菌落。在普通琼脂培养基中菌落生长不良;在血液琼脂培养基中可见灰白、半透明、湿润、表面光滑如露珠样的圆形细小菌落,菌落周围有明显的β-溶血环(2~3.5mm)。取菌落涂片,革兰氏染色镜检,可见多量单个、成双或少量呈短链状排列的革兰氏阳性球菌,有荚膜。

**4.3 生化特性** 将从病料中分离的细菌进行生化鉴定,结果如表1。生化实验结果表明分离菌株符合猪链球菌的生化特性,证实了猪链球菌病的存在。

表1 细菌生化实验结果

项目	结果	项目	结果
葡萄糖	+	菊糖	+
蔗糖	+	乳糖	+
水杨苷	+	山梨醇	-
海藻糖	+	马尿酸钠	-
棉实糖	+	甘露醇	-

**4.4 PCR检测** 无菌采集病猪的脑、肝、脾、肺等组织病料,由广东佛山科学技术学院预防兽医实验室用PCR方法检测PRV,检测结果为猪伪狂犬病毒呈阳性。

根据以上试验结果和流行病学资料,以及临

床症状与病理剖检变化, 确诊该养户的猪只为猪链球菌病和猪伪狂犬病混合感染。

### 5 防治措施

采取了清除粪便发酵处理, 用 2%~3%火碱溶液对猪舍地面、墙壁、设施及用具等消毒, 每天 2 次, 连续 7 天。用哈尔滨兽研所生产的伪狂犬基因缺失苗 3 头份和猪链球菌多价浓缩灭活苗对外观健康的猪进行强化免疫。用黄芪多糖注射液配合维生素 B<sub>1</sub> 维生素 B<sub>12</sub> 和维生素 C 对病猪进行肌肉注射, 每天 1 次, 连用 3 天。病猪用青、链霉素和安乃近按说明用量肌肉注射, 每天 2 次, 连用 3 天。同时对重病猪进行补糖、补液等对症治疗。通过采

取以上综合治疗措施, 7 天后猪群病情得到控制。

### 6 小结

6.1 要坚持自繁自养, 若需引进外来猪, 应到无病区及无病猪场购买, 经当地检疫部门检疫合格发给检疫合格证, 才能持证运输。购回以后, 必须隔离饲养 15 d 后, 方可混群饲养。

6.2 养猪户必须健全兽医卫生防疫制度。要搞好环境卫生, 严格消毒、药物预防等综合防治措施, 才能避免疫病的侵入。

6.3 发现病猪要做到及时隔离、治疗, 淘汰发病猪, 防止该病的蔓延扩散。



(上接第 44 页)

接触后, 仍有感染传染病的可能。第四, 接种疫苗后并非一劳永逸, 每年应按时或定期接种疫苗才能获得良好的保护力。

### 5 免疫接种失败的原因

5.1 疫苗质量 这是免疫失败的关键所在。应当使用生产技术规范、弱毒苗有活力、灭活苗具有有效含量和获得批准文号的来自正规渠道的疫苗。

5.2 贮存不当 光照太强、温度不当、疫苗瓶内非真空、超过有效期等, 都会导致疫苗质量下降甚至失效。通常弱毒苗和湿苗在 -15℃ 以下保存, 而灭活苗和耐热冻干弱毒苗在 2℃~8℃ 保存。

5.3 抗体水平 犬接种疫苗后一般 10~15 天产生免疫力, 完成全程注射 1 个月, 才能达到有效抗体水平。因此, 在完成全程注射前, 抗体未产生或滴度较低, 此时犬仍有发生传染病的可能。

5.4 母源抗体 新生仔犬可通过吮吸母犬初乳获得一定量的免疫抗体, 这些抗体可抵御某些病原的侵袭, 对仔犬的保护作用大约可维持 8~12 周。由于母源抗体能干扰并中和疫苗病毒的抗原性, 对仔犬的主动免疫产生干扰。因此对新购入的幼犬, 在母体免疫状况不明的情况下, 可加大首免剂量以保证免疫效果。

5.5 潜伏感染 接种疫苗产生的抗体只对血液中的病毒有效, 对已进入细胞的病毒无效。如犬在注射疫苗前已经感染了病毒, 此时注射疫苗不仅无效, 反而会加重病情甚至死亡。

5.6 使用不当 疫苗稀释不当、混入有配伍禁忌的药物或其他疫苗、稀释过的活苗没有及时用完、

免疫接种剂量不足或遗漏等情况, 都会导致免疫失败。使用疫苗后, 应对疫苗瓶及包装物等集中销毁。

5.7 注射不当 选择皮下注射, 免疫效果慢且不确实。选择臀部注射, 因臀部脂肪组织多, 免疫活性细胞少, 注射后产生的抗体滴度低, 抗体下降速度也快。

另外, 由于某些病毒常发生变异, 如疫苗毒株与本地流行毒株不同, 也会造成免疫失败。

### 6 接种疫苗应注意的问题

6.1 对刚买回来的犬最好先驱虫, 在家里饲养 14 天后若无异常情况再行免疫接种, 可以避免因应激导致体质下降, 也可避免在感染潜伏期内盲目接种。因为在非健康状态下, 或幼犬处于感染潜伏期, 接种疫苗将可能引起发病。应当注意的是, 家养犬即使不外出也应注射疫苗, 因为主人外出有可能将有关病原带回家中引起感染。

6.2 接种疫苗时要对犬进行体检, 包括体温、呼吸、心跳次数等, 观察眼角有无脓性分泌物、有无鼻涕等。鼻端湿润、口腔黏膜颜色正常、眼结膜无新生血管、无呕吐、腹泻等现象, 且精神和食欲正常时, 才可接种疫苗。接种疫苗前应先给犬洗澡, 接种后 7 天内不要洗澡, 以免引起感冒而影响免疫效果。

6.3 使用有效期内的疫苗, 按照疫苗使用说明书配制。灭活苗用前摇匀, 冻结后不能使用。接种时使用一次性注射器, 并待酒精消毒皮肤干燥后再行注射, 以避免疫苗与酒精接触而失效。注射部位选颈部肌肉为好。接种弱毒苗 7 天内, 不得使用抗菌、抑菌药物。有的犬注射部位出现红肿, 但一般 2~3 天可自行消失。



# 浅谈中西医结合治疗牛青桐叶中毒病的体会

李天海

(四川省会理县畜牧局, 四川 会理 615100)

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0049-02

会理县栎属植物分布广、数量多,山区养牛多以放牧为主,农牧民对本病缺乏认识,因采割、采食嫩叶而引发牛青桐叶中毒较为普遍,对养牛业造成了较大损失。该病在国内外均有报道,但目前尚无治疗该病的特效药物和特殊治疗方法。笔者自开展对牛青桐叶中毒病诊治以来,经过长期探索,总结出用中西医结合及民间土方草药的综合治疗方法,取得了较好的效果。

## 1 发病原因

**1.1 社会因素** 根据实地调查,本病一般在3月下旬至5月中旬发生。会理县山区的青桐树主要有槲栎、麻栎、柞栎、大叶栎、栓皮栎等五种,它们均属栎属植物,因这种树适应性很强,发芽早,生长快,在春夏之交,其他植物还未发芽,它却长出了叶子。在山区牛多以放牧为主,部分农户有采割青桐叶垫圈积肥习惯,增加了牛摄入青桐叶的机会。特别是山区广大农牧民文化知识普遍较低,对青桐叶的危害缺乏认识,因春夏之交缺草而把青桐树叶充当牧草喂牛,也是造成本病发生的一个原因。

**1.2 青桐叶的毒物成分** 据报道,青桐叶、花、果实均含有有毒物质,尤以嫩叶和花含毒最高。主要毒素有水溶性鞣酸、没食子鞣酸等。4月份含量可高达15.3%,而10月份则可下降至4.19%。由此可见,叶中毒物含量随着生长时间的增长而逐渐减少。根据临床调查,牛对青桐叶中毒的危害程度与个体的耐受性、年龄、日采食的数量有很大关系。采食量多的发病快,病情严重,致死率高。据调查统计,日采食10 kg左右,3~5天发病;5 kg以下10天左右发病,采食青桐叶总量达到30~50 kg即可出现明显的临床症状。

## 2 临床症状

笔者通过多例青桐叶中毒病例的临床观察,临床症状以消化和排泄机能紊乱为特征,主要表

现尿闭和水肿。其临床症状通常分为初、中、晚三期。初期病牛精神沉郁,行动迟缓,食欲异常,腹痛,口色青白,苔薄或无苔,厌食青草,少吃干草,饮水量少,尿少且清淡、透明有泡沫,口干,鼻镜干燥。中期食欲减退,只食少量干草,不吃青草。不饮,反刍少而磨牙,常回头视腹甚至踢腹,频频起卧、呻吟,尿少甚至尿闭,耳鼻俱凉,鼻镜干燥开裂,躯体远端厥冷,口色青白,苔白津滑,心跳加快,脉细弱,可见呼吸困难和会阴至胸部腹部局部水肿。后期精神高度沉郁,腹痛明显,呼吸困难,鼻腔内有脓性鼻液,水肿加剧,可见全身多处水肿,腹围加大,尿闭,牛体出现恶臭,寒颤明显,常卧地不起。口色青紫,体温下降,最后衰竭而死。

## 3 病理变化

剖检可见胸腹腔积水,肝和胃水肿,胆囊肿大,瘤胃、真胃出血,内容物发干,整个肠道呈条状或点状出血,粘膜脱落。心脏内外膜亦有散在出血点。

## 4 治疗

由于没有特效药物,笔者采取中西医结合的方法,对症施治,取得良好效果,治愈率达90%以上。

**4.1 润肠:**内服石蜡油1 000~1 500 mL。

**4.2** 对于早期病牛,西药采用5%葡萄糖生理盐水1 000 mL,碳酸氢钠250 mL,一次静脉滴注;中药采用党参、干姜、白术、干草、建曲、麦芽、山楂各60 g,厚朴、附子、肉桂、茯苓、车前子各50 g,煎水分3次灌服,1剂/日,连用3日。对于中后期病牛,西药采用5%葡萄糖生理盐水1 000 mL,速尿20 mL,20%的安那加10 mL,Vc20 mL,碳酸氢钠250 mL,一次静脉滴注;中药采用党参、白术、甘草、干姜、附子、肉桂、茯苓各60 g,车前子40 g,建曲、麦芽、山楂、玉米须各100 g,煎水分3次灌服,1剂/日,连用7日。

**4.3** 给病牛饲喂易消化的干草和让其进行适当

的运动。

**4.4 保温:**因露宿、饮凉水能使病畜病情加重甚至死亡,治疗过程中杜绝病畜露宿和饮凉水。

## 5 小结与体会

**5.1** 该病的治愈率与发现及时,准确诊断,妥善治疗和良好的饲养管理密切相关。

**5.2** 中西医结合治疗见效快,治愈率高。西医以补液、强心、利尿、解毒、消肿、配合健胃通便为治则。中医以温中散寒、健脾和胃、渗湿利水、解毒通便为治则。

**5.3** 中医辨证与方解:青桐叶中毒病主要表现为虚寒的症候。形寒怕冷,耳鼻俱凉,四肢厥冷,多卧少立,肠鸣泄泻,慢草不食,完谷不化,可见浮肿,口

色青淡,舌苔薄白,脉象迟涩、细数等,故属脾胃虚寒证。因此用“理中汤”(党参、白术、甘草、干姜)进行加减,对症治疗。初期用理中汤加建曲、麦芽、山楂、厚朴等,温中散寒、行气燥湿、健胃和中。中期用“理中汤”加附子、肉桂、茯苓、车前子等,温中散寒,回阳救逆,渗湿利水,消肿止痛。后期则在中期的基础上加大药物剂量,重用党参、附子、肉桂和茯苓,再加上葡萄糖、安钠加等强心利尿消肿。

**5.4** 青桐叶中毒病季节性强,主要发病于春夏之交,应加强饲养管理,避免在低矮的青桐树林中放牧,或在放牧前饲喂适当的碱水或高锰酸钾水预防本病的发生。

(上接第46页)

种在3.5~4.5月龄)出现首次发情,这时因性机能尚未发育完全而不能配种,应将公母羊分开饲养放牧,不能让其自由交配。

**4.2.2 体成熟** 一般早熟品种在8~9月龄,体重达到22.5 kg,晚熟品种在12~18月龄,其形态结构和生理机能才基本成熟,此时方可开始配种。

**4.2.3 发情周期** 山羊的发情周期一般为18~21天,平均为20天。发情持续期为1~2天,平均为40 h。

**4.3 适时配种** 在母羊发情后12~24 h内配种。一般是当日上午母羊发情,当日下午就配种;下午发情,次日上午配种。为提高母羊受胎率,以一个发情期配种2次为宜,间隔10~12 h再配一次。产后母羊一般在分娩后第2~3周开始发情。

**4.4 怀孕母羊后期管理** 怀孕母羊后期(怀孕110天)和哺乳期要从大栏内分开单栏饲养。对怀孕母羊和哺乳母羊补喂精料,日喂量为50~150 g,以稻谷、玉米或掺入20%的炒黄豆最好。

## 5 把好疫病防治关

**5.1** 坚持以“预防为主”的方针,做好防疫工作。新引进的山羊要隔离养殖2~3周,同时驱虫后再合群。自繁自养是预防疾病发生、消除传染来源的重要环节,而预防接种则是预防疫病发生的关键。每年对种羊群注射羊痘、口蹄疫疫苗以及三联四防疫苗(即防羊快疫、羊猝狙、肠毒血症、羔羊痢疾)各2次。每次接种后应进行登记,免疫保护期到期后要及时补免。

**5.2 平时做好清洁、消毒工作** 做好羊群的洗浴卫生,及时清除粪便堆积发酵,并采用10%~20%石灰乳、20%的漂白粉溶液等定期对羊舍进行全面消毒,用量约为1 L/m<sup>2</sup>,用喷雾器喷洒地面、墙、舍顶。一般每两周用0.1%K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>水消毒饮水槽和食槽一次,羊舍每半个月消毒一次。每年2~3次空舍彻底消毒。消毒程序:彻底清扫→清水冲洗→烧碱水喷洒→次日冲洗,并空舍5~7天。

## 5.3 定期驱除体内外寄生虫

**5.3.1 体外寄生** 主要是由疥螨、棉虫、羊癣引起,以皮肤发痒、脱毛、皮肤发炎、消瘦为主要症状。治疗方法:一是药浴法,选用0.3%~1%敌百虫药水、0.025%~0.05%的双甲脒乳液或疥虱灵1:400兑水进行药浴。药浴需选择晴朗温暖的日子,浴前8 h停止采食,浴前2~3 h让羊饮足水,以防羊进入浴池后误饮药水造成中毒。先浴健康羊,再浴患寄生虫病的羊;药液要淹没羊的全身,并把羊头压入药液中1~2次;浴后滴留20 min;怀孕2个月以上的母羊不能药浴。二是注射法,注射虫克星水剂0.02 mL/kg体重,效果非常好。

**5.3.2 体内寄生虫** 主要是由球虫、绦虫、肝片吸虫、线虫引起发病,以消瘦、毛黄、腹泻、贫血、厌食为主要症状。治疗方法:一是内服药物法,选用盐酸左旋咪唑(片剂),每2.5 kg体重投喂一片;或硫双二氯酚(片剂),每5 kg体重投喂一片;二是注射法,注射虫克星0.02 mL/kg体重。注意怀孕后期的母羊不宜驱虫。

# 奶牛子宫蓄脓的治疗体会

刘瑞鑫, 罗鲜青, 黄光云

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001)

中图分类号: S858.23

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0051-01

奶牛子宫蓄脓即患牛子宫角内充满脓性分泌物,卧时常流出大量成团成块、黄色的脓性物。通常为双侧子宫角发病,偶尔也有单侧子宫角发病,牛多为子宫内膜炎不治疗或治疗不及时,炎症扩散转变为慢性炎症所致。本人从事奶牛繁殖工作以来,遇到了不少奶牛子宫蓄脓病例,现总结如下:

## 1 典型病例介绍

**1.1 病例 1** 患牛卧地时有脓性粘液或黄色成团、成块脓物流出,直检见双侧子宫角如两月胎儿大小,按摩时流出大量脓性物质。

**处理方法:**先按摩双侧子宫角排出部分脓状物后,冲入 0.1%  $\text{KMnO}_4$  1 000~1 500 mL,继续按摩双侧子宫,并引流冲洗液,如此反复冲洗 2~3 次,最后留 0.1%  $\text{KMnO}_4$  500 mL 在子宫内。隔天再重复操作一次,间隔两天后双侧子宫角各注入高效米先(苏州科牧公司生产)50 mL,3 天后再用药一次,间隔一周后再给药一次。2 头奶牛经过上述处理后,子宫均恢复正常,后正常发情,配种(配种前 1 h 青霉素 160 万 IU×2+链霉素 100 万 IU×1,生理盐水 40 mL)后均受孕并成功产下犊牛。

**1.2 病例 2** 4 头患牛均为子宫蓄脓,卧地时均流出黄色脓状物,其中两头比较严重,直检时发现双侧子宫角比较硬,有如拳头大,脓物比较多。

**处理方法:**土霉素溶液(人用土霉素 0.25 g/片×40 片,溶于 50 mL 生理盐水)50 mL/次,双侧子宫角对分注入,隔天 1 次,连用 3 次为一疗程。一疗程结束后隔 1 周再宫注 60 mL 土霉素溶液,每侧 30 mL。此时直检发现 1 头患牛子宫颈内有拳头大肿块,间隔 1 周后再用药 1 次,重检发现肿块有变大变硬的趋势,初步诊断为子宫肌瘤,不再治疗。最后一次给药后 10 天直检,2 头患牛子宫已恢复正常,另 1 头子宫稍硬。后对子宫稍硬的奶牛进行超数排卵处理,反应良好,共回收胚胎 8 枚,其中可用胚胎 3 枚。

**1.3 病例 3** 4 头奶牛均为子宫蓄脓,直检发现双侧子宫角均充满脓性物,有波动感,较柔软,似有 3

个月胎儿大小,卧时流出黄色浓豆腐花样脓状物。

**处理方法:**(1) 患牛双侧子宫角内各注入 30 mL 土霉素溶液(配法同病例 2),隔天 1 次,连用 3 次为一疗程,连用 3 个疗程后,仍未见好转。(2) 改用 0.1% 碘液(5% 碘酒 1 mL 稀释于 20 mL 生理盐水)注入子宫内,隔天后每侧子宫各注入新宫得康 1 支,并按摩子宫。经此处理后仍未见好转迹象,于是臀部肌肉注射氯前列醇注射液(PG,齐鲁动物保健品厂产)2 支/头。肌注后第 2 天见患牛流出一大碗黄色浓豆腐花样脓物,此时直检子宫仍似 3 个月胎儿大小,第 3 天上午用生理盐水 1 000~1 500 mL 冲洗子宫,按摩后引流,引流完毕后每侧子宫各注入新宫得康 1 支并按摩。1 周后直检,4 头患牛子宫基本恢复正常,各牛再每侧子宫注入新宫得康 1 支,10 天后直检,4 头患牛子宫完全恢复正常。对其中 3 头奶牛进行超数排卵处理,反应良好,除 1 头没有回收到胚胎外,另 2 头共回收到 10 枚胚胎,其中可用胚胎 5 枚。另 1 头奶牛发情配种后已受孕。

## 2 体会

**2.1** 子宫蓄脓症多为子宫内膜炎不治疗或治疗不及时,炎症扩散后转为慢性炎症所致,如再不治疗,则患牛完全失去繁育能力,损失较大。该病的治疗关键是做到早发现,早治疗,对症下药。子宫冲洗、按摩、引流后给药,是治疗子宫蓄脓的较好方法。

**2.2** 子宫冲洗、引流、给药时可用不锈钢子宫灌液枪或塑料软管,注意在直肠内的手一定要把握好枪头,严禁用力过猛,以防穿破或损伤子宫壁,避免更大的损失。子宫冲洗时,冲洗液应保持 37~40℃,这样能够增强子宫的血液循环,避免过冷的冲洗液对奶牛机体的应激,从而改善生殖器官的代谢。

**2.3** 从治疗实践看,某种方法并不是对所有的病例都有效。因此必须分析患牛情况,查明原因,再选择适当的方法。当发现一种方法无效时,应立即改换其它方法。要求尽量做到无菌操作,严格消毒患牛后阴周围,动作要轻柔,切忌粗鲁。

# 一起兔瘟的诊断报告

温娟; 黄苑; 周春芝

(广西壮族自治区南宁市动物疫病预防控制中心, 广西 南宁 530001)

中图分类号: S858.291

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2009)04-0052-01

兔瘟, 又称兔出血症、兔出血热, 是由出血性病毒引起的一种高度接触性传染的急性、致死性传染病。该病主要经消化道、呼吸道和皮肤伤口传播。各种家兔均可感染发病, 但以长毛兔最敏感。3月龄以上的青年兔与成年兔发病率和死亡率可高达90%~100%。月龄越小发病率越低, 乳兔一般不发病。临床特点是发病急、病程短、体温高。最急性的, 突然倒地、抽搐、尖叫而死。2006年南宁市发生一起病例, 现报告如下:

## 1 发病情况

该市一兔场, 存栏兔1 100只, 有种兔、仔兔和幼兔。2006年3月12日晚上开始出现兔子死亡, 至3月16日共死亡300多只。死亡兔均为已断奶仔兔(一般在31-35日龄断奶), 幼兔没有死亡。

## 2 临床症状

死亡急。未见临床症状, 突然尖叫、抽搐, 十多分钟后即死亡。死兔多数见鼻孔流血, 有的见肛门、阴门出血。

## 3 肉眼病变

剖检死兔5只, 见胸腹腔内有血水, 血液凝固不良; 胃内充满新鲜食料; 肝肾出血。

## 4 实验室诊断

**4.1 细菌分离** 用病死兔淋巴结、脾脏、肝脏、心包液涂片, 革兰氏染色, 显微镜下观察, 未发现细菌。用病死兔淋巴结、脾脏、肝脏、心包液分别接种胰酶大豆琼脂培养基, 37℃恒温培养, 分别在24 h、48 h观察, 未见菌落生长。

**4.2 凝集试验** 用濒死兔肝脏制成肝组织悬液, 4 000 rpm离心15 min, 取1滴上清液置于载玻片上, 加入O型血1滴, 混匀观察, 出现明显的凝集反应。其余上清液加庆大霉素(2 000 μ/mL), 放冰箱作用过夜, 备用。

## 4.3 动物试验

**4.3.1** 购买未接种兔瘟疫苗的成年兔3只。测量体温, 正常时进行试验。2只兔颈部皮下注射肝组织悬液, 2 mL/只; 对照兔注射同量生理盐水。试验兔和对照兔分开饲养, 饲养条件相同。

**4.3.2** 注射后24 h, 2只试验兔发病死亡; 对照兔正常存活。剖检试验兔见血液凝固不良, 肺出血, 胸腔有血水, 气管内有带血气泡。用试验死亡兔肝组织悬液与人O型血进行凝集试验, 同样出现明显凝集反应。

根据临床表现和实验室检查结果, 诊断为兔瘟, 即兔出血症。

## 5 控制措施

隔离病兔, 将病死兔及其污染物深埋或烧毁; 对被污染的场地和粪便等用2%烧碱水进行消毒。未发病兔紧急注射兔瘟灭活疫苗, 2 mL/只。

## 6 防控结果

疫苗注射后死亡增多, 平均每天死亡70只, 6天后基本停止死亡, 疫情平息。

### 中国最大的禽流感疫苗生产基地落户广东肇庆

广东肇庆将成为集生物药品及兽药生产、生物技术研究开发等科研一体的禽流感疫苗生产基地。近日广东肇庆大华南生物药品有限公司表示, 八月建成投产后, 公司将成为中国最大的禽流感疫苗生产基地。

该禽流感疫苗生产基地为公司的GMP三车间, 投资五百万美元, 两条完整的禽流感H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>亚型灭活疫苗生产线和实验动物房, 占地面积四十亩。据公司有关负责人介绍, 该项目采用目前国内和借鉴国外同行企业先进的技术成熟设备和制造工艺, 设备自动化程度高, 减少人工操作对产品品质的影响, 确保每批次产品的均质性, 年生产“禽流感灭活疫苗”三十亿羽份。

公司表示, GMP三车间建成后, 年产禽流感疫苗达六十五亿羽份, 年产值达六亿元人民币, 成为中国最大的禽流感疫苗生产基地, 并规划第四期扩建工程。(信息来源: <http://www.china-ah.com>)