牛结核病现状及诊断技术研究进展

牛结核病是一种人畜共患的疫病,在全球范围内的传播范围都比较广泛。近些年,随着我国畜牧业的不断发展,各地相关部门对牛结核病的重视度越来越高,畜牧疫病防治技术人员也在积极对此疾病的治疗防治工作进行探究,从而为推进我国奶牛、肉牛养殖行业的快速发展提供保障。本文重点阐述了牛结核病现状及诊断技术研究进展,旨在为牛结核病防治工作的开展提供参考借鉴。

■本报记者 杨丽霞 摄

□王永军

牛结核病现状

牛结核病,一种常见的人畜共患传染病,被我国列为二类动物疫病,该疫病的暴发及传染对牛养殖业的发展及民众身体健康带来极大威胁。牛结核病从本质上分析,主要是因感染牛分枝杆菌、结核分枝杆菌而引起的传染性疫病,病毒可通过患病牲畜传染给其他健康动物或人。

随着我国社会经济的飞速发展,畜牧养殖的规模逐渐扩大,越来越多的人选择投入到畜牧养殖行业中,以此来达到经济收益提升的目标,这也间接地为牛结核病的防治工作带来一定困难。牛结核病的防治措施主要有检疫、扑杀等措施,这些措施能够较好地缓解牛结核病的疫病扩散,但我国仍需要面临较为严峻的疫病防治工作。因此,提升对牛结核病的诊断技术研究、牛养殖中的疫病防治措施等工作已经刻不容缓,各部门需要高度重视相关工作,以此来提升我国牛结核病的防治等水平,全面实现有效抑制牛结核病的发生概率,实现促进畜牧养殖业发展的同时保障人们的身体健康。

牛结核病诊断技术

1、牛结核病流行病学研究

目前,牛结核病在全球范围内仍是传播较为广泛的一种人畜共患疾病,其中患有牛结核病的奶牛会直接出现体重下降、产奶量明显降低的临床表现,这会直接对养殖场的经济收益带来不利影响。同时,处于不同生长阶段的牛,在患上结核病后的临床表现都有一定差异,这也为牛结核病诊断技术带来了挑战。经过我国研究人员的多年研究表明,牛结核病不仅对兽类、禽类有一定的传染风险,还会传染人,在牛饲养中以奶牛最易感染牛结核病。

通常散养条件下的牛,其发生牛结核病的概率大约为1%—5%左右,而圈养奶牛的群体中,其传染概率直线上升,其主要原因为圈养牛舍的通风条件、饲养管理、饲料及饮水管理等的科学性不足,进而造成牛结核病病原在密集的牛群中进行传播,造成疫病大范围暴发,为养殖场或养殖户的经济收益带来损失。牛结核病的病菌会存留在奶牛的乳汁中,而健康母牛的奶水也会在挤奶时被空气中的病原菌所污染,人们一旦食用了没有进行杀菌、消毒处理的奶制品,就很容易出现人感染牛肺结核的现象。

2、牛结核病的传播途径

空气传播:即通过牛呼吸道受到疫病菌群侵害,造成感染牛结核病,这种传播主要发生在大规模、集约化的牛养殖场中。其主要原因为牛舍饲养密度过大,空气流通性差,因而出现空气传播的情况。

经口传播:由于牛结核分枝杆菌生命力较强,并不会受到干燥环境或湿冷环境的影响,具备较强的抗逆性。如果病菌生存于水体可以直接生存五个月左右。所以,病原体排泄物中带有大量结核病病毒,排出体外后会对饲料、饮水等外部因素造成污染,甚至导致健康牛受到结核病病毒的侵蚀。

垂直传播:如果处于妊娠期的母牛已经感染牛结核病,就会通过母体胎盘将携带的病菌直接感染犊牛,一旦犊牛感染牛结核病,其死亡率会大幅度提升。

3、易感染动物及感染途径

经过科研专家的不断研究,逐渐发现牛结核分枝杆菌除了能对牛进行感染以外,还能够造成其他动物如猪、羊等染病。已感染的病牛通过产生的飞沫,将病菌分散在空气中,其他健康动物通过呼吸被污染的空气,造成病菌感染。通常,牛的主要感染途径为受污染饲料、饮水、撕咬等;而人的主要感染途径为消化道感染,即通过食用病牛的肉制品,造成感染牛结核病菌。另外,部分养殖场依旧用患病母牛的乳汁喂养犊牛,也会造成犊牛感染。

流行病学研究

1、养殖场消毒管理

养殖场的消毒管理工作直接关系到牛结核病发病传染概率,如果养殖场的消毒管理工作不到位,出入圈舍时未能及时更换衣物或佩戴专用鞋帽;消毒手段单一或消毒不彻底等,都会增加牛结核病的患病概率。此外,养殖场粪污无害化处理不到位,不但会污染土壤,同时也会造成粪污中携带的病菌在养殖场中传播、蔓延,严重危害养殖场的发展。

2、流动和隔离

在规模化养殖场运营中,其需要通过引进牛种来丰富养殖场养殖品种,扩大养殖规模,但这种频繁性的牛运输,极有可能造成牛在运输中感染病菌。如果新牛进入养殖场后没有及时做好隔离、观察措施,或未经检疫就直接投入牛群进行混养,将会增加牛结核病传染、蔓延的概率。

3、牛结核病检测

当前,部分养殖场、养殖户并没有高度重视对牛养殖过程中的病害监测,配合动物防疫部门开展牛结核病检测工作的积极性不高。特别是在疾病出现高峰期的春、秋季期间,未及时对养殖场中的肉牛开展全面的牛结核病检测工作,从而导致大量患病阳性病牛不能及时被检出,出现牛结核病发生传播、扩散的现象。另外,也可能由于养殖户检验能力的不同,导致局部检验结果存在偏差,出现伪阳性、假阴性的状况发生。所以,养殖场、养殖户必须协助政府部门在专用的实验室内开展全面检验工作,以此来提高检测结论的真实性。

诊断检测技术

目前,我国针对牛结核病检测的方式主要有细菌学检测方法、免疫学检测方法、分子生物学方法等多种,具体如下:

1、细菌学检测方法

主要包括抹片抗酸染色技术、微生物离心培养技术两类,其中抹片抗酸染色技术具备检验速度快、操作方法简便的优点,而且几乎没有被环境因素干扰,但也具有检验精度差、容易产生伪阳性表达等不足。另外,细菌学测试技术的测试时间相对较长,一般需要八周左右,这就增加了检测试验对象的污染危险。

2、免疫学检测方法

该方法属于当前比较常见的一种检测方式,其具备操作简单、检测时间短、灵敏度高、可直接判断等特点,非常适合应用在野外或大规模养殖场的全面检测工作中。

3、分子生物学方法

主要包括核酸探针、PCR和DNA图谱等技术。该技术是当前实验室研究牛结核病常用技术之一,具有敏感性高、特异性好的特点。由于分子生物学检测需要配备特殊且价格较高的仪器设备,才能够完成皮内变态反应、ELISA试验,这对实验室的条件及实验人员的操作水平都要求较高,因此该技术目前只能够运用在实验室研究,还不能在更为广泛的基层推广应用。

结语

牛结核病是一种人畜共患的疫病,在全球范围内的传播范围都比较广泛,如果检测、防控工作不及时就会出现人畜共患的情况,对人们的身体健康,奶牛、肉牛养殖行业的发展造成不良影响。所以,养殖场、养殖户必须高度重视该疾病的防治工作,加强牛舍、饲料、饮水等环节的消毒管理工作,出入牛舍要严格进行防护消毒工作,严格规定奶牛、肉牛饲养的免疫、驱虫等操作,主动协调有关机构、单位做好春秋两季的牛结核病检测工作,如果发现有牛结核病阳性病例必须在第一时间进行报告,及时对其进行扑杀等无害化处理。

同时,对出现的可疑阳性病例、检测阴性病例的疑似患病牛等进行隔离、监管措施,主动协调有关单位进行牛结核病防控工作,以此有效维护我国畜牧业的安全生产。

(作者单位:山东省济南市动物疫病预防与控制中心)

褪黑素在牛体外胚胎生产中的应用研究进展

□阎来庆 刘雪凝 刘巧香 刘国世

近年来牛体外胚胎生产取得很大进展,可以稳定地在体外获得囊胚,但体外生产效率偏低,不能满足产业需要。在牛体外胚胎生产过程中很容易产生活性氧和活性氮,导致配子和胚胎受到氧化应激或硝化应激。褪黑素作为一种强有力的抗氧化剂和抗凋亡剂,可以直接清除有毒的氧衍生物,减少活性氧的形成,在牛体外胚胎生产过程中发挥积极作用。本文主要对褪黑素在牛卵母细胞体外成熟、体外受精、早期胚胎发育、配子和胚胎冷冻保存等方面的研究进行综述,为后续体外胚胎生产技术的优化研究和推广应用提供参考。

褪黑素在牛卵母细胞体外成熟中的作用

卵母细胞成熟包括发育中卵子的核和胞质成熟。卵母细胞核成熟是指在排卵时从第一次减数分裂前期到第二次减数分裂中期(MII)的减数分裂过程。随着核成熟,卵母细胞内细胞器、蛋白质和转录本发生一系列变化,进而达到卵母细胞质成熟。在体外条件下,牛卵母细胞通常会在20—24小时完成核成熟到MII。

哺乳动物卵巢中存在褪黑素的膜受体和核受体,褪黑素在卵巢中的某些作用可能与膜受体有关。这些受体也存在于颗粒细胞和卵泡膜细胞中,表明褪黑素可直接作用于卵巢细胞,并调节卵巢相关生理活动。褪黑素膜受体mRNAs也存在于牛卵母细胞和牛卵丘细胞中,并对卵母细胞质和核的成熟有积极影响。

在体外成熟过程中,氧化应激是造成卵母细胞损伤的主要原因之一。体外处理过程中,卵母细胞长时间暴露在光线下,环境氧气浓度升高可导致ROS增加。研究发现在体外成熟培养液中添加褪黑素可以显著降低牛卵母细胞的ROS水平,并促进牛卵母细胞的体外成熟。El-Raey等研究发现,在成熟液中添加10纳克/毫升、50纳克/毫升褪黑素可促进体外成熟卵母细胞从MI期向MII期的核转变,并且能够提高卵母细胞胞浆内线粒体弥散分布和卵丘细胞扩张的比率,获得较高的成熟率。Tian等研究发现褪黑素受体基因MT1和MT2在卵母细胞、卵丘细胞和颗粒细胞中都有表达,推测褪黑素对卵母细胞成熟的影响是通过受体实现。

褪黑素不但能促进体外牛卵母细胞的成熟,还能够缓解一些恶劣条件下的卵母细胞体外成熟。褪黑素可以挽救农药百草枯PQ对牛卵母细胞的损伤,通过抑制卵母细胞内ROS产生,提高谷胱甘肽GSH和抗氧化相关基因CAT和Gpx4 mRNA水平,使丝裂原活化蛋白激酶p38MAPK信号通路失活,从而使凋亡相关的Bcl2/Bax mRNA比值发生有利的变化,从而阻止PQ诱导的细胞凋亡。Yaacobi-Artzi等研究发现,褪黑素通过降低ROS水平从而在一定程度上减轻热休克对牛卵母细胞减数分裂的影响,虽然热休克牛卵母细胞发育的囊胚比例不受褪黑素影响,但线粒体功能相关基因的表达相对较高。

以上研究表明,无论是在体内正常生理条件下,还是在体外应激及恶劣条件下,褪黑素对牛卵母细胞成熟都起着积极作用,然而不同条件下褪黑素作用的具体通路和机制还有待进一步研究。

褪黑素在牛体外受精过程中的作用

体外成熟完成后,通常对精子进行洗涤和选择,以去除冷冻液、精浆、碎片和死亡精子,精子与卵母细胞共孵育18—24小时,进行体外受精。牛精液的质量和卵母细胞成熟效果对牛胚胎体外受精至关重要。

褪黑素对牛卵母细胞体外成熟和卵母细胞体外受精起积极作用。在体外受精过程中,皮质颗粒(CGs)的胞吐(皮质反应)是卵母细胞用来防止多精受精的最常见机制之一,CGs的正常分布是确保单精子受精所必需的。Juno蛋白在阻止多精受精方面也起着重要作用。Zhao等研究表明,褪黑素处理组的卵母细胞中CGs的正常分布率更高,Juno表达水平更高,结果证明褪黑素通过改善细胞器的正常分布,提高细胞内谷胱甘肽(GSH)和三磷酸腺苷(ATP)水平,增强抗氧化基因表达水平,调节受精相关事件,进而提高受精能力和发育能力。

精子在体外培养过程中易受氧化应激影响,这是因为精子的细胞膜富含多不饱和脂肪酸,对体外培养过程中产生的ROS很敏感,导致脂质过氧化(LPO),接下来产生细胞毒性醛(如丙二醛)等连锁反应。丙二醛可以与蛋白质结合并诱导关键细胞蛋白质的氧化修饰,对线粒体功能产生负面影响,并对精子的中段和轴丝结构造成损害。此外,LPO增加和膜功能改变可以通过降低新陈代谢、活力、顶体反应、反应性和融合能力,以及对精子DNA的氧化损伤从而导致精子功能障碍,这些变化共同导致体外受精能力低下。

孙业清研究发现褪黑素处理精子会显著降低精子细胞内的ROS水平,质膜、线粒体膜和顶体完整的精子比例提高,精液品质得到明显改善。Cheuquemán等报道褪黑素浓度对公牛精子有模式效应,在生理浓度下具有获能调节作用和保护作用。随着牛产业的逐步发展,性控精液在牛场繁育过程中扮演着重要角色。褪黑素不但对常规选择下的精子起作用,其对性别控制选择的精液也有着重要作用。Li等研究发现褪黑素会显著降低公牛性别分离精子的ROS水平,提高超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性,抑制磷脂酰丝氨酸外化和丙二醛水平,提高线粒体膜电位Δψm、顶体完整率和受精能力,从而提高体外受精效率。

褪黑素在牛早期胚胎发育中的作用

在体外受精(IVF)后,受精的卵母细胞在体外培养7天,20%—40%的受精卵到达囊胚阶段。家畜胚胎含有较高含量的脂质,在早期胚胎发育过程中起着重要的能量代谢作用。体外胚胎生产效率较低的原因可能与胚胎暴露在相对较高的氧气浓度下有关,这会导致ROS的产生增加。ROS的产生被认为是体外胚胎产量低的主要原因,这是由于过量的ROS会与脂质相互作用,从而破坏关键的细胞分子,导致膜完整性丧失、蛋白质结构或功能改变以及核酸损伤。ROS还参与线粒体改变、胚胎阻滞、ATP耗竭和细胞凋亡等进程进而影响胚胎的发育和着床。

Wang等研究发现褪黑素上调促类固醇基因CYP11A1、CYP19A1和STAR表达,促进卵丘-卵母细胞复合体(COCs)孕酮和雌二醇的分泌;褪黑素通过降低胚胎内的ROS水平提高牛的孤雌生殖、雄核胚胎发育、胚胎卵裂率和桑椹胚、囊胚发育率。在胚胎体外培养液中添加褪黑素可以促进牛胚胎的体外发育,上调牛胚胎发育过程中抗氧化抗凋亡基因GPX4、SOD1和BCL2和发育相关重要基因SLC2A1、DNMT1A和DSC2的表达,同时下调促凋亡基因P53、Bax和Caspase3的表达,提高卵裂率和囊胚率。Marques等实验表明褪黑素处理能提高囊胚发育效率,减少凋亡细胞数,增强抗氧化基因SOD2和热休克蛋白HSPB1的表达水平。

褪黑素和AKT(一种丝氨酸/苏氨酸特异的蛋白激酶)被确定为生殖所必需的几个细胞过程的调节器。El等研究发现,褪黑素可以消除AKT抑制剂SH6在牛卵母细胞和胚胎中的抗发育作用,具体体现在卵裂率和囊胚率的提高以及线粒体形态的改善;MARF1、GDF-9、BMP-15、MARF1、ATPase、ATP5F1E、POLG2、HAS2、TNFAIP6和Ptgs2等成熟、线粒体和卵丘扩张相关基因表达上调,Bcl2相关的凋亡调节因子Bax、caspase 3和p21表达下调。

在明确褪黑素对牛早期胚胎的有益作用后,一些学者选择一些更有效的供给褪黑素方式来代替在体外添加。Komninou等研究褪黑素纳米胶囊对牛胚胎体外培养的影响,发现褪黑素脂核纳米囊通过下调Bax、Casp3和Shc1基因的表达,上调CAT和Sod2基因的表达,从而增加胚胎细胞数,降低细胞凋亡率和活性氧水平,提高胚胎孵化率。

以上研究均证实了褪黑素对牛体外早期胚胎发育有着重要作用,接下来研究人员转向研究在特殊情况下褪黑素在早期胚胎发育过程中的作用。Su等将褪黑素添加在体细胞核移植(SCNT)早期胚胎的发育液中,发现褪黑素影响凋亡、抗氧化和发育相关基因的表达,改变组蛋白H3的K9乙酰化,增加SCNT囊胚的细胞总数和内细胞团细胞数,减少SCNT胚胎的凋亡和ROS水平,进而提高体细胞核移植牛早期胚胎的妊娠和出生率。Gutiérrez-Añez等研究发现褪黑素可以改善初情期前的COCs在体外发育到囊胚的效率,在褪黑素添加后初情期前奶牛COCs的胚胎中胚胎细胞数达到成年奶牛水平。

褪黑素在牛配子和胚胎冷冻中的作用

配子和胚胎冷冻保存是胚胎工程中的重要环节,也是动物保种、基因库建立的必要手段。利用冷冻保存技术能够保存珍稀动物品种和优良生产性能家畜的遗传资源,促进转基因技术在生物医学研究方面的发展,推广胚胎移植技术在畜牧业生产中的应用。冷冻保存和胚胎移植可以经济、省力地储存和运输有价值的遗传物质,在降低疾病风险方面也有很大的优势。然而配子和胚胎的特殊结构导致其对低温十分敏感,配子和胚胎在冷冻解冻过程中也很容易产生ROS和RNS,进而导致配子和胚胎受到氧化应激的影响和细胞器的损伤。

精子的存活率、活力和膜完整性会在冷冻过程中下降,冷冻——解冻过程中的冷休克还可能破坏线粒体以及精子的质膜和顶体膜。Ashrafi等研究发现在精液稀释液中添加褪黑素可以抵消冷冻解冻过程对公牛精子活力、存活率、形态正常和质膜完整性的不利影响。Pang等研究发现褪黑素处理牛精子后,精子与体外培养胚胎受精后胚胎发育到囊胚的比率显著提高,囊胚的凋亡率显著降低;褪黑素处理的精子产生的胚胎中CASP3和BAX丰度显著降低,而BCL、XIAP和CAT转录丰度显著升高。Perumal等在牛体内埋植褪黑素后采集精液体外冷冻解冻,发现精液的运动参数、线粒体膜电位、抗氧化特性、核畸形比率、细胞内酶流失以及精子体外透明带结合能力指数均有显著改善。

玻璃化冷冻会降低哺乳动物卵母细胞的发育潜力和胚胎的着床能力,这主要是由于玻璃化冷冻导致卵母细胞中ROS活性和凋亡水平异常升高所致。褪黑素可以有效改善此类情况,提高体外卵母细胞和胚胎的冷冻效率。Zhao等研究发现在体外成熟液和玻璃化冷冻液中加入褪黑素可降低玻璃化卵母细胞的ROS、线粒体钙离子、Bax mRNA表达和Caspase3蛋白水平,降低磷脂酰丝氨酸外部化和DNA碎片率,提高线粒体膜电位和Bcl2 mRNA的表达水平,从而提高玻璃化冷冻卵母细胞孤雌激活后的发育能力。

在褪黑素对牛胚胎冷冻保存方面,Wang等研究发现,褪黑素可显著提高解冻后24—72小时的囊胚孵化率,显著降低解冻后48—72小时的死亡率;胚胎培养过程中加入褪黑素,解冻后DNMT3A、OCC、CDH1基因表达显著增加,AQP3基因表达显著降低,提高牛胚胎的冷冻耐受性,从而提高牛胚胎质量。Marques等研究培养液中添加褪黑素和玻璃化冷冻前去除囊胚液体对牛体外胚胎质量和存活率的影响,发现在冷冻保存前添加褪黑素可提高胚胎的孵化率,提高编码热休克蛋白基因HSPA5的表达;此外,在培养液中添加褪黑素对玻璃化冷冻囊胚的形态质量、存活率、升温后胚胎耐受性以及胚胎存活率都有着积极的作用。综上研究都表明褪黑素不但对牛配子和胚胎体外正常条件下有着保护和促进作用,而且对牛配子和胚胎冷冻保存也有积极影响。

展望

随着各种新的辅助生殖技术在牛场中的应用,牛体外胚胎生产对牛场的生产经营和发展变得愈发重要。在体外胚胎生产过程中的氧化应激是限制其发展的主要因素之一,近些年褪黑素被认为是一种重要的自由基清除剂,它的抗氧化性得到充分关注。目前已有多项研究表明,褪黑素在牛体外胚胎生产过程中有着积极的作用,然而褪黑素在体外培养不同条件下的添加方式和浓度还需要进一步研究,以及褪黑素在这些过程中的具体作用机制还需要深入探索。