

开产蛋鸡传染性喉气管炎的 PCR 诊断及防治

郭小参^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 杨明凡^{1,2}, 陈红英^{1,2}, 管倩^{1,2}, 吕晓丽^{1,2}, 王东方^{1,2}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 郑州 450002)

中图分类号: S858.31

文献标识码: B

文章编号: 1671-7236(2007)09-0100-02

鸡传染性喉气管炎 (infectious laryngotracheitis, ILT) 是由鸡传染性喉气管炎病毒 (ILT) 引起的鸡的一种急性接触性呼吸道传染病。病鸡主要表现为呼吸困难、咳嗽、喘气、甩头, 严重者咳出血样粘液。病理剖检可见喉头及气管黏膜肿胀、弥漫性出血, 表面附着带血的渗出物或黄色干酪样假膜 (郑海洲等, 2003), 有时这种渗出物呈块状或长条状, 会将气管完全堵塞。各种年龄的鸡均可发生本病, 主要见于成年鸡, 中小鸡也易感, 野鸡、孔雀、火鸡和鹌鹑

等也有发生。本病初次感染时, 发病率接近 100%, 死亡率高达 70%, 平均死亡率为 10%~40%, 蛋鸡的产蛋量明显下降, 是危害养禽业的重要疫病之一 (Calnek, 1997; Walter 等, 2000)。2006 年 10 月禹州某养鸡场发生一起以开产蛋鸡呼吸困难、咳嗽、咳出带血渗出物, 喉部和气管黏膜肿胀、出血并形成糜烂为特征的传染病。经 PCR 检测确诊为传染性喉气管炎病毒感染。并采取了防治措施, 取得了较好效果, 现报告如下。

1 发病情况

该鸡场饲养有 5000 只罗曼蛋鸡, 按正常免疫程序免疫新城疫、法氏囊、传支和减蛋综合症疫苗, 但没有免疫鸡传染性喉气管炎疫苗。在 150 日龄时开始有个别鸡出现呼吸道症状。咳嗽、气喘、鼻腔流出半透明状渗出物; 随后发病鸡只开始增多, 呼吸困难, 呼吸时发出湿性啰音, 咳出带血粘液, 有的病鸡

收稿日期: 2007-03-05

作者简介: 郭小参 (1982-), 男, 河南人, 硕士生, 主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。

通讯作者: 崔保安 (1948-), 男, 河南人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

基金项目: 国家“十五”食品安全重大攻关专项 (2001BA804A30-11)。

前生产实际中最常用的猪瘟免疫效果监测评估方法, 二者各有其优点。阻断 ELISA 试验操作简便快速, 一次性处理样品数量大, 可以应用计算机处理, 重复性高, 操作条件要求严格, 成本较高; 正向间接血凝试验操作简便快速, 要求条件简单, 成本低, 处理数量大的样品时工作量大, 结果判定要求较丰富的经验作基础。

通过上述 2 种方法的检测, A、B、C 3 个规模化猪场的猪瘟免疫效果: 正向间接血凝试验评估结果 A 猪场的免疫合格率为 79.2%, B 猪场的免疫合格率为 90.0%, C 猪场的免疫合格率为 52.7%; 阻断 ELISA 试验评估结果 A 猪场的免疫合格率 76.7%, B 猪场的免疫合格率为 86.7%, C 猪场的免疫合格率为 50.0%。不难看出 B 猪场群体猪瘟抗体水平优于 A、C 猪场, 说明 B 猪场的免疫程序科学合理, A 猪场次之, C 猪场的免疫程序极不合理, 急需调整猪瘟免疫程序。建议 A 猪场猪瘟首免日龄由 25 日龄调整到 30 日龄; C 猪场猪瘟首免日龄由

25 日龄调整到零日龄超前免疫, A、C 猪场调整后需继续检测评估, 确保猪瘟免疫程序科学合理。

通过阻断 ELISA 试验和猪瘟正向间接血凝试验的平行对比, 结果显示 2 种方法在对猪群体的免疫效果评估上具有很高的相关性, 群体猪瘟抗体效价分布具有平行性, 2 种方法平行检测结果的符合率大于 85%。但我们同时也发现 3 个猪场都有部分猪只的血清猪瘟抗体阻断 ELISA 试验和正向间接血凝试验检测评估结果差异很大, 这充分说明这 2 种方法在评估个体猪只上相关性不高, 可能与 2 种方法所检测的抗体类型不同有一定关系。阻断 ELISA 试验、猪瘟正向间接血凝试验和中和试验的相关性如何, 有待于进一步研究探讨。

通过平行对比试验, 可以看出上述 2 种检测方法均可用于规模化猪场群体猪瘟免疫状况的整体评估, 都能对群体猪瘟抗体的消长作出及时客观的评估, 对规模化猪场猪瘟免疫程序的制订或调整提供科学依据。

因气管内渗出物不能咳出而窒息死亡。产蛋量由发病前的 30 % 迅速下降到 5 % 左右,薄壳蛋、白壳蛋和无壳蛋增多。剖检病死鸡,发现鼻孔中蓄积粘性渗出物,喉头和气管黏膜肿胀,有针尖状弥漫性小出血点,气管内有血样渗出物和血凝块。根据临床症状和剖检病变初步诊断为传染性喉气管炎。

2 实验室检查

采集发病鸡喉头、气管等病料,待分离病毒后进行 PCR 检测。

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 公布 ILTV gD 序列设计 1 对引物,可扩增出长度约为 576 bp 的片段,上游引物 P1: 5'-GCGCAAACA GCTCTCGTA-3',下游引物 P2: 5'-GCAACGCCGCGGATATG-3'。由上海生物工程有限公司合成。

2.2 病毒分离 取发病鸡喉头、气管等病料剪碎研磨,然后用 PBS 缓冲液 5 倍稀释,反复冻融 3 次,4、6000 r/min 离心 10 min,收集上清 -20 保存备用。

2.3 传染性喉气管炎病毒 DNA 的提取 取上清液 300 μ l,加入等体积裂解液 (5 mol/L GuSCN, 0.05 mol/L Tris-HCl pH 6.4, 0.02 mol/L EDTA pH 8.0) 混匀,37 作用 30 min。然后加入等体积的平衡酚,混匀。12000 r/min 离心 5 min,取上清,经酚 氯仿 异戊醇 (25:24:1) 再次抽提后用 2 倍体积的异丙醇沉淀, -20 放置 30 min, 12000 r/min 离心 10 min, 70 % 乙醇洗涤 2 次,干燥,加入 20 μ l 灭菌去离子水溶解,贮存于 -20 备用。

2.4 传染性喉气管炎病毒 gD 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系: DNA 模板 5 μ l, Ex Taq 预混酶 25 μ l, 上游引物 (50 pmol) 0.5 μ l, 下游下游引物 (50 pmol) 0.5 μ l, 加 ddH₂O 补至 50 μ l。反应条件: 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 50 退火 50 s, 72 延伸 45 s, 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min。

取 PCR 产物用 1.2 % 琼脂糖凝胶进行电泳检测。结果待检样品扩增得到一条 576 bp 的特异性条带,而对照组没有扩出目的条带 (图 1)。

结合临床症状及剖检变化确诊为鸡传染性喉气管炎。

3 防治方法

对患病鸡群进行隔离,全群消毒。用喉康中药,每袋拌料 50 kg,自由采食,连用 5 d。用黄芪多糖饮水,每袋加清水 50 kg, 2 次/d, 连饮 4 d。饮水中加入复方多维以消除鸡群应激反应,增强抵抗力。该鸡群在用药后第 2 d 呼吸道症状开始减轻,第 4 d

仅有个别鸡只有轻微的呼吸道症状,此时采食量开始恢复,产蛋率开始有所回升。

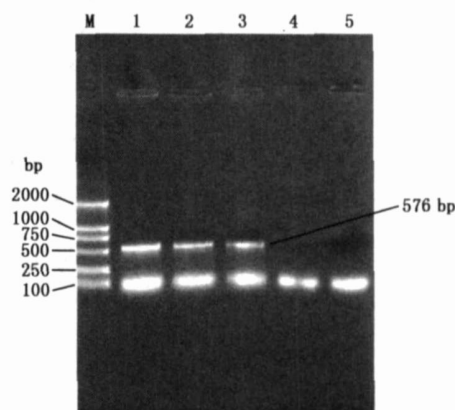


图 1 ILTV gD 基因扩增结果

注: M, DL 2000 Marker; 1、2、3, 发病鸡喉头、气管 (病料); 4, 正常鸡喉头、气管; 5, 鸡传染性支气管炎病毒。

4 讨论

本试验根据 GenBank 公布 ILTV gD 基因序列,设计并合成了一对引物,以发病鸡喉头气管组织样品的 DNA 为模板,通过 PCR 扩增出一段长 576 bp 的 ILTV 基因片段。扩增的基因片段大小与目的基因一致。而鸡正常喉气管组织和鸡传染性支气管炎病毒扩增不出任何条带,说明所建立的 PCR 检测方法对 ILTV 是特异的。

目前诊断 ILTV 主要用琼脂凝胶免疫沉淀法 (AGID)、免疫荧光 (FA)、病毒分离 (VI)、血清中和试验 (SN)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。但这些方法都比较烦琐,敏感性或特异性较差 (任红梅等, 2000)。但随着分子生物学研究的不断发展,分子生物学诊断技术,如核酸分子杂交和 PCR 诊断技术,以敏感性高、特异性强而广泛用于实验室和临床样品中病毒的检测。具有省时、省力、敏感性高和特异性强等优点的 PCR 技术在鸡传染性喉气管炎病的临床诊断中必将得到更加广泛的推广应用。

参 考 文 献

- 1 任红梅,庄文忠,等. 鸡传染性喉气管炎病毒 PCR 诊断技术研究 [J]. 山东农业科学, 2000, 5: 42 ~ 44.
- 2 孙照刚,徐玉辉,张曼夫. 一种独特的疱疹病毒—鸡传染性喉气管炎病毒. 中国畜牧兽医, 2005, 32(9): 54 ~ 56.
- 3 郑海洲,苏钢,等. 鸡传染性喉气管炎病毒病原学和基因工程疫苗的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2003, 37 (3): 42 ~ 45.
- 4 Walter F, Katharina Z, Jens P T, et al. The nonessential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor [J]. Journal of General Virology, 2000, 81: 627 ~ 638.