

胡新岗,黄银云,郭广富,等. 山羊支原体山羊肺炎亚种的 PCR 测定及动物回归试验[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):254-255.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.071

山羊支原体山羊肺炎亚种的 PCR 测定及动物回归试验

胡新岗¹,黄银云¹,郭广富¹,朱止南²,田亚军³,许余良⁴

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300,2. 江苏省泰州市高港区动物卫生监督所,江苏高港 225300,

3. 江苏省泰州市高港区胡庄畜牧兽医站,江苏高港 225300,4. 江苏省泰兴市畜牧兽医技术推广中心,江苏泰兴 225400)

摘要:江苏省泰州市肉山羊养殖业时常发生山羊支原体性肺炎,基于临床上山羊支原体性肺炎病原的多样性以及支原体分离培养的困难性,以疑似山羊支原体肺炎病例肺组织、胸腔渗出液、心包液为病料,采用 PCR 技术检测并进行动物回归试验,首次证实泰州地区山羊支原体性肺炎病例中存在山羊支原体山羊肺炎亚种病原,为当地临床防治该病提供了科学依据。

关键词:肉山羊;支原体;山羊肺炎亚种;PCR 检测;防治

中图分类号: S858.27 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0254-02

山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia,CCPP),是山羊养殖中常见的急性或慢性高度接触性呼吸道传染病,是世界动物卫生组织(OIE)法定报告动物传染病之一,我国于2010年首次向OIE通报此病。临床由山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)引起,以呈现纤维素性肺炎和胸外膜炎为特征^[1]。除Mccp以外,临床上能够引起山羊支原体性肺炎的主要病原还有丝状支原体山羊亚种(Mmc)、绵羊肺炎支原体(Movi)等,而几种支原体在同一羊群中出现混合感染的情况也不鲜见^[2]。由于临床上支原体的分离与培养十分困难,非专业实验室无法做到,而且这些支原体引起的山羊支原体性肺炎在临床症状、大体病变仅凭肉眼难以区分,致使羊场技术人员及基层兽医基本上只能凭经验用药,而无法针对病原支原体进行科学合理用药^[3]。

江苏省泰州市肉山羊养殖业方兴未艾,羊肉的需求在当地逐年攀升,但山羊支原体性肺炎严重影响了当地肉山羊养殖业的发展。为探明泰州市是否确实存在山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)的流行,为该病的防治提供理论依据,近年来,江苏农牧科技职业学院课题组联合有关基层兽医及防检部门专家开展了该病病原的分子生物学(PCR)检测并通过动物回归试验,首次证实泰州地区确实存在由山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)引起的山羊传染性胸膜肺炎。

1 材料与方法

1.1 病料来源

无菌操作,采集江苏省泰州市(精确到区)某山羊养殖场发生呼吸道疾病,经初步诊断为山羊传染性胸膜肺炎,使用抗生素治疗效果不佳,临床症状明显,肺脏呈现典型纤维素性肺

炎的病山羊肺脏、胸腔渗出液及心包液,-20℃冷冻作为病料备用。

1.1.1 仪器设备 Mikro200R 冷冻高速离心机、JS-380A 自动凝胶图像分析仪、PCR 仪(PTC-200rev)、DYY-7C 型电泳仪、DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳槽、恒温箱、微量移液器等。

1.1.2 试剂 基因组 DNA 快速抽提试剂盒(动物)、Taq DNA 聚合酶、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl₂、10×PCR buffer、100 bp DNA Ladder 和 6×DNA 凝胶载入染料>Loading Dye)均购自上海生工生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。山羊支原体山羊肺炎亚种 Mccp 正向间接血凝诊断试剂盒、丝状支原体山羊亚种 Mmc 正向间接血凝诊断试剂盒、绵羊肺炎支原体 Mo 正向间接血凝诊断试剂盒购自中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.2 方法

1.2.1 病料采集和处理 在肺组织病变与健康组织交界处无菌取样,将 0.5~1 g 肺组织研磨研碎,按 1:4 加入无菌含双抗的 pH 值为 7.2 的 PBS 溶液,混匀后分装到 EP 管;胸腔渗出液和心包积液取上清,分装到 EP 管。处理好的病料于冰箱-20℃保存备用。

1.2.2 引物的设计与合成 根据文献[4]的方法,合成 1 对 Mccp 引物,片段针对 Mccp Adi 基因中的一段序列,长 316 bp。引物序列为:上游引物:5'-ATCATTTTAATCCCTTCAAG-3';下游引物:5'-TACTATGAGTAATTATAATATATGCAA-3',由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 组织病料 DNA 的提取 用基因组 DNA 快速抽提试剂盒,按说明书上的操作方法提取组织病料 DNA。具体步骤如下:

①3 000 r/min 离心 10 min,取上清 200 μL 转移至新 EP 管中;②加入 400 μL buffer Digestion,振荡混匀,65℃水浴 60 min;③加入 200 μL buffer PA,充分颠倒混匀,-20℃下保存 5 min;④室温 10 000 r/min 离心 5 min,取上清 500 μL 转移至新 EP 管中;⑤加 500 μL 异丙醇,颠倒 5~8 次混匀,室温放置 2 min,室温 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;⑥加 1 000 μL 75% 乙醇,颠倒漂洗 2 min,10 000 r/min 离心 2 min,

收稿日期:2015-03-30

基金项目:江苏省高校“青蓝工程”资助项目;江苏农牧科技职业学院重点科研项目(编号 NSFZD1303)。

作者简介:胡新岗(1974—),男,安徽宿州人,硕士,副教授,主要从事动物疫病防控研究及动物医学专业教学工作。E-mail:gxh008@qq.com。

弃上清;⑦重复⑥步骤 1 次;⑧开盖室温倒置 5~10 min;⑨加入 100~200 μL TE buffer 溶解。⑩-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即进行下一步试验。

1.2.4 PCR 检测 Mccp 以提取的组织病料 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 50 μL 反应体系:5 μL 10 \times buffer、3 μL 25 mmol/L MgCl_2 、1 μL 10 mmol/L dNTPs、上下游引物各 1 μL 、3 μL cDNA、*Taq* DNA 聚合酶 1 μL ,用灭菌超纯水补足 50 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,47 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察电泳图谱,拍照记录结果。

1.2.5 动物回归试验 选择 6 只临床健康体质量为 5 kg 的波尔杂交肉山羊,购进后投服驱虫药物,预饲 7 d,预饲期间每天分别于上午、下午测温 1 次,采血后采用购自中国农业科学院兰州兽医研究所研制的山羊支原体山羊肺炎亚种 Mccp 正向间接血凝诊断试剂盒、丝状支原体山羊亚种 MMC 正向间接血凝诊断试剂盒、绵羊肺炎支原体 MO 正向间接血凝诊断试剂盒检测,确定无支原体感染。采用自然病例胸腔渗出液、心包液原液,经 PCR 检测、确认存在 Mccp 后,以 10 倍生理盐水稀释液,通过气管注射和滴鼻 2 种途径接种其中 4 只,留取 2 只仅注射等量生理盐水作为对照。常规饲养管理,重视环境消毒,逐日观察并记录症状,扑杀后记录病变。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

对病料进行 PCR 检测,得到 MCCP 目的基因片段,片段大小为 316 bp(图 1),与预期的结果相符。

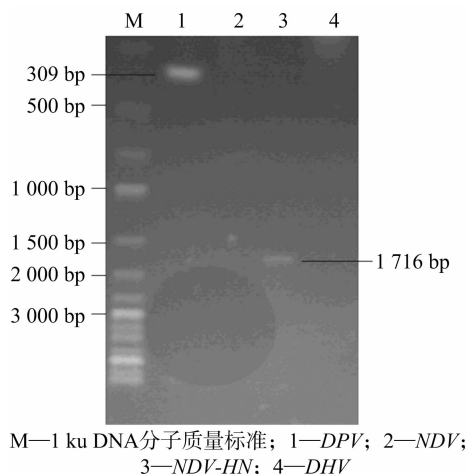


图1 基因片段 PCR 扩增结果

2.2 动物回归试验结果

4 只试验羊分别在接种后 15、17、22、26 d 表现症状,最初病羊喜卧,间歇性咳嗽,体温略有升高,食欲有所下降,但仍会进食并反刍。随病程发展,病羊不愿走动,或蜷卧低头闭目,或四肢外展站立,脖颈伸直,呼吸急促,剧烈咳嗽,闭眼,眼睑周围有浆液性分泌物,口鼻流涎,鼻孔逐渐被脓性分泌物堵塞,反刍停止、腹泻及肛周污秽。病程后期,病羊倒地侧卧不起,急促腹式呼吸,舌头伸出,痛苦呻吟,不久即死亡 3 只。剖

检可见病羊病变仅限于胸腔,呈典型胸膜肺炎病变,主要表现为单侧性局部肝样变,胸腔有大量渗出液,严重的肺和胸膜粘连,需用手才能剥离肺脏。对比可知,试验羊的临床症状和病理变化与本试验中自然发病羊一致。利用采自试验羊的病料,再行 PCR 鉴定,仍然可以得到本研究中的 PCR 扩增结果,进一步证实,本研究中山羊传染性胸膜肺炎的病原为山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)。

3 分析与讨论

由于支原体较难分离与培养,临床上仅靠症状及病理剖检很难确诊山羊支原体性疫病^[3]。在山羊传染性胸膜肺炎病原分离对试验条件的高要求及生产中实际分离率非常低的情况下,临床上采用 PCR 技术直接通过病料快速检测 Mccp 是当前诊断 CCPP 流行病学的有效手段,避免因为漫长而艰难的 Mccp 分离纯化而花费大量的时间、精力和财力,提高临床该病的防治效率和效果^[5]。

国内不同地区山羊传染性胸膜肺炎病原的差异性很大,研制安全高效广谱的支原体疫苗是控制山羊支原体性肺炎的重要途径。目前我国使用的山羊传染性胸膜肺炎灭活疫苗是用丝状支原体山羊亚种(Mmc)制备的,从理论上来说,该疫苗不可能完全保护山羊免受 Mccp 的侵袭^[6]。因此地方政府应联合生物制品生产单位尽快分离地方性流行菌株制备针对地方的可靠疫苗。规模化羊场也可在发病后联合有条件的科研院所制备针对本场的自家苗用于紧急预防。

泰州地区肉羊场山羊传染性胸膜肺炎的发病大多与引入未经检疫的隐性感染羊有关。建议肉羊场大规模引入肉羊前,可先请有条件的单位对拟引入肉羊开展山羊支原体肺炎检测,确认无感染再行引入。引入后应加强饲养管理,严格实施防疫检疫等措施。规模化羊场最好实行自繁自养、全进全出饲养制度,减少因引入新羊带来病原体。一旦发病,不要自行治疗延误时机,应尽快求助兽医部门或权威科研机构帮助确诊,科学合理防控疫情。由于耐过病羊在相当长时间内可通过呼吸道向外界排毒而成为传染源,因此发现病羊务必隔离治疗^[7]。

参考文献:

- [1] 辛九庆,李媛,张建华,等. 一株山羊支原体山羊肺炎亚种的分离鉴定与分子特征[J]. 中国预防兽医学报,2007,29(4):243-248.
- [2] 王华,杨发龙,王永,等. 山羊支原体性肺炎流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(1):210-214.
- [3] 储岳峰,逯忠新,赵萍,等. 丝状支原体山羊亚种抗体间接血凝检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医,2007,39(10):64-66.
- [4] 储岳峰. 我国山羊(接触)传染性胸膜肺炎病原学、流行病学研究及灭活疫苗的研制[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
- [5] 储岳峰,赵萍,高鹏程,等. 从山羊中检测山羊支原体山羊肺炎亚种[J]. 江苏农业学报,2009,25(6):1442-1444.
- [6] 赵萍,储岳峰,高鹏程,等. 羊霉形体病的疫苗预防及药物治疗[J]. 甘肃畜牧兽医,2008,38(4):44-46.
- [7] 张建华,辛九庆,李媛. 山羊传染性胸膜肺炎的诊断与防治[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(3):68-70.