

胡新岗,黄银云,吴 双,等. 樱桃谷肉雏鸭感染鸭瘟、副黏病毒的 PCR 鉴定与防控[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):344-346.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.100

樱桃谷肉雏鸭感染鸭瘟、副黏病毒的 PCR 鉴定与防控

胡新岗,黄银云,吴 双,郭广富

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:根据发病情况、临床症状、病理变化,初诊江苏省泰州市某肉鸭养殖户饲养的肉鸭群疑似感染鸭瘟,通过 PCR 方法鉴定该群病鸭混合感染鸭瘟病毒和副黏病毒,采取全群扑杀、彻底消毒、扑灭疫情等措施进行防治,并针对我国肉鸭养殖中鸭瘟、鸭副黏病毒病流行的新态势提出具体的防控举措。

关键词:樱桃谷雏鸭;鸭瘟;副黏病毒;PCR;疫情;防控

中图分类号: S858.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0344-02

鸭瘟(DP)别称鸭病毒性肠炎,由鸭瘟病毒(DPV)引起,属于急性、高致死性的病毒性传染病,该病在我国广大养鸭地区散在发生,不同龄期、性别、品种的鸭均可发生典型鸭瘟,临床以蛋鸭、成年种鸭多见^[1]。随着我国肉鸭养殖业的不断发展,鸭瘟在肉鸭群中的发病率明显上升,未免疫鸭群的死亡率可达 100%^[2]。鸭副黏病毒病也被称为鸭源新城疫,由禽副黏病毒 I 型的鸭副黏病毒(DPMV)引起,属于急性、高度接触性传染病^[3]。在肉鸭养殖中,鸭瘟及鸭副黏病毒病的临床病例报道不多,同一病例呈现鸭瘟病毒和副黏病毒混合感染的现象更无报道,笔者在工作中意外遇到了 1 例罕有病例,确诊为樱桃谷肉鸭混合感染鸭瘟和鸭副黏病毒病,鉴于目前我国肉鸭养殖业对这 2 种病的认识和重视程度不足,疫情防控缺乏经验,特将案例报道如下。

1 疫情调查

1.1 发病情况

2014 年 4 月,江苏省泰州市某肉鸭养殖户反映,其大棚饲养的 2 000 余羽 13 日龄樱桃谷肉鸭于 9 日龄起感染发病,在临床症状、病理变化等方面与鸭瘟相似,但考虑到 10 日龄左右的鸭苗不太可能会发生鸭瘟,因此未予重视,怀疑是细菌性传染病,养殖户自行购买氟苯尼考等多种抗菌药物进行防治,使用效果不佳,每天死亡十几羽至几十羽不等,由于此前几批鸭也有类似情况,为弄清病因,找到有效的防治措施,养殖户请求江苏农牧科技职业学院帮助诊断,此时鸭群死亡率已近 70%。鸭主反映该鸭群系本地某鸭场繁育的鸭苗,未予接种任何疫苗,基本上不进行任何消毒。现场走访可见鸭场管理不善,鸭舍环境脏乱,人员流动无阻。

1.2 临床症状及病理变化

发病鸭表现出采食减少或食欲废绝、饮欲增加、运动失调、两腿无力、行走时摇摆不稳、头缩颈软、角弓反张等神经症状。个体检查可见病鸭流泪,眼有分泌物,腹泻,排出淡绿色

稀粪,泄殖腔黏膜充血。剖检可见肝脏肿大,棕红色,有灰白色、针头大坏死灶,实质较脆,胆囊肿大,充满较浓的墨绿色胆汁,心包液增量,心包膜增厚,纤维索性心包炎,纤维索性气囊炎,气囊上有块状纤维索性渗出物附着,脾脏肿大,表面斑驳呈大理石状,气管环充血、出血,脑膜充血、水肿,肠黏膜充血、出血,胰腺发炎、充血,胸壁有淡黄色胶样渗出物。根据病理变化,结合发病过程及多种抗菌药物治疗不佳等情况,初步诊断为鸭瘟,怀疑感染副黏病毒。

1.3 分子生物学诊断

1.3.1 病料 来自上述疑似感染鸭瘟病毒及副黏病毒且临床症状及病理变化明显病例的肝、脾、肺、胰等。

1.3.2 常用分子生物学试剂 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Murine RNase Inhibitor 和 HiScript[®] Reverse Transcriptase 购自南京诺唯赞生物科技有限公司,2 × Lamp MasterMix(含染料)购自康为世纪生物科技有限公司,6 nt 随机引物购自 Fermentas 公司。

1.3.3 双抗 PBS 的配制 根据 OIE 推荐的配方略作调整,用 pH 值 7.2 的 PBS 溶液配制运输液,溶液中抗生素剂量为:Penicilin(青霉素)10 000 U/mL、Streptomycin(链霉素)10 mg/mL,最后用 10 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值为 7.2。

1.3.4 引物设计与合成 根据 EMBL/GenBank 公布的 3 种病毒的相关基因序列,运用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 4 对引物,由上海英潍捷基生物技术有限公司,序列见表 1。

1.3.5 病毒的 RNA、DNA 提取 将发生疑似病毒感染雏鸭器官病料剪碎研磨,加入预冷双抗的 PBS,反复冻融 3 次后经 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 10 min,每份吸取 200 μL 上清用于病毒基因组提取。根据病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA、DNA 提取,测其含量为 720 μg/μL,用 6 nt 随机引物进行反转录(65 ℃ 加热 5 min,迅速置于冰上骤冷,并静置 2 min),根据 HiScript[®] Reverse Transcriptase 说明书进行反转录获得病毒的 cDNA(置 PCR 仪上反应,50 ℃ 45 min,85 ℃ 5 min)。

1.3.6 基因片段的扩增 根据 2 × Lamp MasterMix(含染料)说明书进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s;根据引物调整退火温度,DPV、NDV、NDV-HN 均为 55 ℃,DHV 为 50 ℃,72 ℃ 下延伸时间依次为 20 s、2 min、

收稿日期:2015-03-26

基金项目:江苏省高校“青蓝工程”。

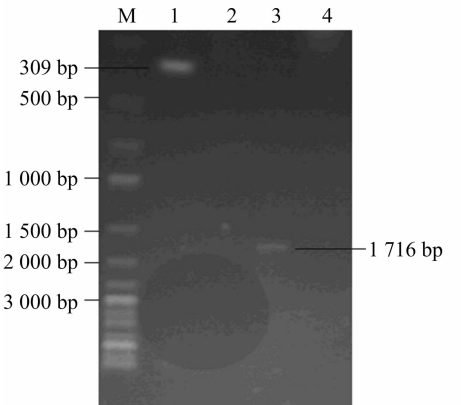
作者简介:胡新岗(1974—),男,安徽宿州人,硕士,副教授,从事动物疫病防控研究及动物医学教学工作。E-mail:gxh008@qq.com。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
DPV	F:CGGGATCCTGCCAGTGGACAGTTTGA;R:GCGTCGACGTGATTGTTCCGGGAGTG	309
NDV	F:TAGCAAATGCCTCTCCCCAG;R:ACCGTTCTACCCGTGTATTGC	2 135
NDV-HN	F:ACCATGGACCGCGCGTTAACAGAGT;R:CTTTTAAACTCTATCATCCTTGA	1 716
DHV-VP3	F:GTACATATGGGAAAGAGAAAACCACGC;R:CTAGTCGACCTGATTATTGGTTGCCAT	711

1.2 min、30 s、30 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 产物凝胶电泳检测。

1.3.7 基因片段的扩增结果 对上述 DNA 和 cDNA 进行 PCR 扩增,电泳检测发现,DPV 和 NDV-HN 出现的条带与预期结果一致(图 1)。PCR 扩增结果确诊该鸭群感染了鸭瘟病毒及副黏病毒。



M—1 ku DNA 分子质量标准;1—DPV;2—NDV;3—NDV-HN;4—DHV

图1 基因片段 PCR 扩增结果

2 疫情处理方法

鉴于鸭瘟、鸭副黏病毒病均为严重危害肉鸭养殖的重要传染病,建议立即全群扑杀剩余鸭,焚烧后深埋处理。从鸭棚移出各种生产用具,用 0.02% 二氯异氰尿酸钠溶液、5% 漂白粉溶液等浸泡洗刷。彻底清除鸭棚内的粪便、垫草、垫料及杂物,能焚烧的予以焚烧,不能焚烧的拌合生石灰粉后深埋。采用 5% 过氧乙酸、0.5% 癸甲溴铵溶液交叉反复多次消毒地面及环境。按 1 m³ 空间 25 mL 福尔马林、12.5 mL 水、25 g 高锰酸钾的比例进行鸭舍熏蒸消毒 12~24 h,熏蒸消毒完成后,通风换气,空舍 2~4 周后再引入鸭苗。疫苗免疫是控制鸭瘟流行的主要措施,肉鸭虽然饲养周期短,但免疫不能掉以轻心。据报道,鸭接种弱毒疫苗数小时后,即可不同程度地抵抗鸭瘟野毒的攻击^[4]。因此,为预防雏鸭感染鸭瘟,购买鸭苗时必须问清种鸭是否免疫鸭瘟活疫苗,以确定鸭苗体内的母源抗体情况,如种鸭未免疫鸭瘟活疫苗,则雏鸭必须尽早免疫。可在雏鸭 1 日龄时注射鸭瘟活疫苗,按瓶签标明羽份,用生理盐水稀释,每羽腿肌或颈侧皮下注射 0.25 mL,免疫期 1 个月。也可尝试用鸭瘟活疫苗按 1:5(1 个免疫量溶于 5 mL 水中)进行饮水免疫,饮水免疫前应停止供水一段时间,增加鸭的饮欲,以便通过饮水快速摄入足够的疫苗。建议免疫前进行环境彻底消毒,免疫后 1 周内不要进行环境消毒^[5]。严格执行兽医卫生制度,及时清除粪便及受污染的垫草垫料,及时通风换气,保证空气清新,定期消毒鸭舍、运动场、水池,勤清洗消

毒水槽、料槽。疫情发生后,应每天全面消毒,直至扑灭疫情。发现病鸭及时隔离诊治,尽量不自行用药,应向当地兽医部门求助,确保正确诊断、合理用药。由于鸭瘟病毒能在耐过鸭体内形成潜伏感染并能复发,在感染后 4 年内仍能向外界排毒而成为传染源^[6]。鸭场发生鸭瘟疫情,扑杀病鸭是清除传染源的重要手段。调查发现,肉鸭的发病死亡主要发生在 2 周龄以内,在此期间应注意通过饮水或拌料添加禽用多种维生素,以增强雏鸭的免疫力。如鸭群粪便不正常,可用 0.02% 高锰酸钾液饮水或添加抗菌药物,确保肉鸭健康快速生长、减少病死率、提高养鸭效益。

3 结论与讨论

通常水禽不能自然感染副黏病毒感染,即使强毒感染也不表现症状,但可从鸭、鹅等体内分离出病毒。胡北侠等在规模化养殖场种鸭副黏病毒带毒监测研究中发现,健康肉用种鸭群在特定的时间副黏病毒带毒率高达 100%^[7]。吴峻华在福建省福州市部分鸭场检出鸭血清样品副黏病毒抗体阳性率达 28.7%,说明鸭副黏病毒感染情况呈现严峻态势^[8]。由于种蛋可以携带病毒,雏鸭早期发病可能主要与孵化及出雏过程中病毒污染有关。研究表明,人工感染鸭副黏病毒的肉鸭,虽然临床症状不甚明显,剖检病变也较轻微,但会导致组织器官持续性严重病理损伤,是导致感染鸭群体质量、大小产生显著发育差异的根本原因,副黏病毒隐性感染的疫情是鸭副黏病毒病的主要流行形式^[9]。由此可以解释本次疫情的 2 个现象:一是该批肉鸭按常规饲养却出现体质量、大小具有明显差异现象,二是鸭群并未表现出副黏病毒感染的明显症状和典型病变。从而也可以推断本次疫情由鸭瘟病毒感染主导,副黏病毒感染起到了促进发病、死亡的作用。

一般认为,鸭瘟多见于 2 月龄以上的成年鸭,特别是种鸭、成年蛋用鸭,由于肉鸭鸭瘟很少发生,没能引起肉鸭饲养户甚至基层兽医技术人员的重视,从而造成该病暴发,给养鸭户造成了较大的经济损失^[10]。因此,随着肉鸭养殖业的发展和养殖方式的多样化,生产上应加强肉鸭鸭瘟免疫预防。此外,肉鸭副黏病毒病危害已经比较严重,鸭副黏病毒病与鸡新城疫疫苗株建的同源性较低,现有新城疫疫苗无法对鸭提供有效保护,因此有关方面应尽快制备针对鸭的副黏病毒疫苗,在无有效疫苗之前,肉鸭养殖只能采取“养、防、检、治”的综合防疫措施应对该病。

参考文献:

[1] 辛朝安. 禽病学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,2003:122-127.
[2] 王红海,胡薛英,苏敬良,等. 商品肉鸭鸭瘟病毒的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报,2006,28(1):105-108.

张晶晶,张勤文,俞红贤,等.大通牦牛肺血管低氧适应的组织结构特点[J].江苏农业科学,2016,44(6):346-347.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.101

大通牦牛肺血管低氧适应的组织结构特点

张晶晶,张勤文,俞红贤,李莉,荆海霞,魏青,梁林,王志强

(青海大学农牧学院动物医学系,青海西宁 810016)

摘要:为进一步研究大通牦牛肺组织对高原低氧适应的组织学特点,选取海拔高度 3 700、3 200 m 地区的成年大通牦牛作为研究对象,并分别选取海拔高度 3 700 m 的泽库地区成年牦牛、海拔高度 3 200 m 的海晏地区成年牦牛作为对照,利用组织学和电镜技术对肺组织的显微、超微结构进行观测与分析。结果显示:管径大于 100 μm 的牦牛肺血管平滑肌含量随海拔的升高逐渐增加,差异显著($P < 0.05$);管径小于 50 μm 的牦牛肺血管平滑肌含量随海拔的升高逐渐减少,差异显著($P < 0.05$);牦牛肺气屏障随海拔的升高逐渐变薄,部分差异显著($P < 0.05$)。大通牦牛肺脏的结构特点是其能够适应高原低氧环境的组织学基础,也表现出其育种的遗传学特征。

关键词:高原牦牛;不同海拔;肺;低氧适应;组织学特点

中图分类号: S858.237.14⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0346-02

低氧是高原环境的主要特征之一,表现为大气中的氧分压随海拔的升高逐渐降低。有学者研究表明,平原动物急进高原会引起高原性心脏病和“兽胸病”^[1],主要表现为肺动脉高压和右心肥厚。牦牛世代生活在海拔 3 000~5 000 m 的地区,大气中的氧含量仅为海平面地区的 53%~73%。高原世居生物能够很好地适应高原低氧环境,不表现出肺动脉高压,并可通过遗传将其适应性传递给下一代。

肺血管的平滑肌含量显著增加是引起肺动脉高压的组织学基础,这在平原动物急进高原的研究^[2]中已得到证实,但是关于高原牦牛肺血管对低氧的适应仍有学者持不同见解。有学者研究认为,牦牛的肺小动脉壁只有 1 层极薄的弹性层结构,并无平滑肌成分或平滑肌含量较少,低氧不会导致高原牦牛肺血管平滑肌含量增多^[2-3]。但也有学者指出,成年牦牛肺动脉管壁中平滑肌的含量较为丰富,且肺动脉多数为肌性动脉^[4-5]。牦牛肺动脉组织结构与高原低氧关系的研究尚

有较大分歧。选取不同海拔高度下的大通牦牛作为研究对象,对其肺血管结构进行比较,旨在阐明高原牦牛肺血管随海拔升高对高原低氧环境适应的结构学特点及适应机制,研究其是否存在高原低氧环境适应的独特性,并进一步为高原医学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取青海大通地区(海拔 3 200、3 700 m)种牛场的牦牛(以下简称大通牦牛)作为研究对象,并分别选取青海海晏地区(海拔 3 200 m)的高原型牦牛(以下简称海晏牦牛)、青海泽库地区(海拔 3 700 m)的高原型牦牛(以下简称泽库牦牛)各 5 头,临床健康,不计性别。

1.2 方法

1.2.1 取材及样品处理 所有试验牛均于放牧地现场屠宰,立即取材并固定。在每头牦牛的肺尖叶、膈叶、心叶上随机切取肺组织 5 块,组织块大小为 1 cm×2 cm,厚度为 0.5 cm。采取的组织以 4% 多聚甲醛固定 24 h,并按常规方法包埋,4 μm 间隔连续切片后进行苏木精-伊红(H-E)染色。

另在右肺膈叶取 1 mm³ 肺组织块,以 2.5% 戊二醛预固定后进行二次处理包埋,制成 70 nm 超薄切片并进行铀铅双重染色。

1.2.2 测量与计算 每例标本选 5 张组织切片,采用 Olympus BX51 型显微镜进行观察,用图像采集系统(Olympus DP

671-675。

收稿日期:2015-11-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31440084);青海省科技厅项目(编号:2013-Z-713)。

作者简介:张晶晶(1990—),女,硕士研究生,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail:310165666@qq.com。

通信作者:张勤文,教授,主要从事高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系研究。E-mail:82321200@qq.com。

[3]李建侠,刁有祥,刘霞,等.鸭副黏病毒病 RT-PCR 诊断方法的建立与应用[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(11):31-35.

[4]谢秀兰,杨发龙,李阳友,等.鸭瘟强毒株和疫苗株对雏鸭 IFN- γ 基因表达的影响[J].中国畜牧兽医,2011,38(11):174-177.

[5]程安春,汪铭书,刘菲,等.鸭瘟病毒弱毒株在免疫雏鸭体内的分布和排毒规律[J].中国兽医学报,2005,25(3):231-233,258.

[6]岳华,杨发龙,景波,等.鸭瘟病毒在雏鸭体内的动态定量分布及其潜伏部位研究[J].中国预防兽医学报,2007,29(9):

[7]胡北侠,黄艳艳,路希山,等.规模化养殖场种鸭新城疫和 A 型流感病毒带毒监测研究[J].江苏农业科学,2008(6):205-206.

[8]吴峻华.福州市部分鸭场新城疫感染情况的调查[J].养禽与禽病防治,2008(2):42-43.

[9]张训海,王珏,李升和,等.鸭副黏病毒人工感染鸭的病理组织学研究[J].中国预防兽医学报,2010,32(1):27-31.

[10]李明,赵立魁,白静.商品肉鸭鸭瘟病毒河南株的分离与鉴定[J].河南农业科学,2005(10):97-98.