

胡新岗,黄银云,郭广富,等. 利用 PCR 技术检测波杂肉山羊中的绵羊肺炎支原体[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):271-273.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.078

利用 PCR 技术检测波杂肉山羊中的绵羊肺炎支原体

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,江苏泰州 225300;

3. 江苏省泰州市高港区胡庄畜牧兽医站,江苏泰州 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:在江苏省泰州市某波杂肉山羊场开展了疑似山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)感染的流行病学调查、病理剖检,并以疑似病例肺病变组织、胸腔渗出液、心包液为病料,采用 PCR 技术检测,证实泰州地区山羊传染性胸膜肺炎病原中存在绵羊肺炎支原体,同时为当地临床诊断该病提供了分子生物学方法。

关键词:波杂肉山羊;传染性胸膜肺炎;绵羊肺炎支原体;PCR;病理剖检

中图分类号: S858.26 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0271-03

山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)俗称“烂肺病”,是山羊的主要传染病,对山羊养殖业危害十分严重,部分地区的发病率、死亡率分别可达 80%、60%^[1]。该病病原较为复杂,由多种支原体组成,主要有绵羊肺炎支原体(Mov)、丝状支原体山羊亚种(Mmc)、山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)等,这些病原体在一个羊群中可单一感染,也可混合感染,主要临床症状为高热、咳嗽、肺脏及胸膜发生浆液性、纤维素性炎症^[2-3]。长期以来,由于山羊传染性胸膜肺炎病原支原体具有多样性,加上支原体难以分离与

培养,导致生产中对该病的诊断大多以临床症状及病理剖检为主要手段,部分有条件的地方采取血清学方法进行辅助诊断,但效果不佳。由于支原体病原的特殊性,临床上发生该病很难确诊到底是何种支原体感染。江苏农牧科技职业学院相关课题组针对江苏省泰州地区山羊养殖业较为发达、常受疑似山羊传染性胸膜肺炎侵扰而难以确诊的情况,采用分子生物学对该病进行诊断。笔者在对泰州市高港区某波尔杂交肉山羊场的调研中,发现疑似山羊传染性胸膜肺炎病例,通过流行病学调查、病理剖检,初步确诊;后采集病料采用 PCR 方法检测出绵羊肺炎支原体(Mov),为该地区的“烂肺病”确诊提供了分子生物学方法。

收稿日期:2015-04-29

基金项目:江苏省高校青蓝工程;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。

通信作者:黄银云,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。

1 材料与方法

1.1 材料

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

水平棚架栽培提早 4~5 年成园,为人均经营规模的扩大和规模效益的提高开辟了新途径。与现有技术的二主枝整形主枝先端区和主枝基部的果实平均糖度存在极显著差异相比,联体“梳形”整形的主枝先端区和主枝基部的果实平均糖度差异不明显。此外,现有技术的二主枝整形的主枝先端区单位面积着果量特别少。因此,水平棚架单主枝联体“梳形”整形,将复杂的砂梨栽培技术简单化,大幅度提高了作业效率和早期产量,同时使果实品质达到均匀一致的效果,且未发现现有树体生长不良的反应。

参考文献:

- [1]魏树伟,王杰军,王宏伟,等. 梨水平棚架栽培整形修剪技术简述[J]. 落叶果树,2010,42(3):15-17.
- [2]吴继红. 棚架梨水平棚架构建与配套栽培技术[J]. 果农之友,2014(11):13-15.
- [3]杨青松,蔺经,李晓刚,等. 4 种棚架树形对梨生长结果和果实品质的影响[J]. 江苏农业科学,2007(6):150-152.

表 3 整形方式对主枝不同部位着果数及果实品质的影响

| 处理 | 着果部位 | 着果量(个/m ²) | 平均单果质量(g) | 糖度(%) | 硬度(kg/m ²) |
|----------|-------|------------------------|-----------|-------|------------------------|
| 联体“梳形”整形 | 主枝基部区 | 11.4 | 421 | 12.7 | 3.8 |
| | 主枝中部区 | 10.2 | 430 | 12.9 | 4.0 |
| | 主枝先端区 | 8.6 | 435 | 13.0 | 4.0 |
| | 差异显著性 | — | — | Ns | ** |
| 二主枝整形 | 主枝基部区 | 7.9 | 381 | 12.6 | 3.9 |
| | 主枝中部区 | 8.6 | 400 | 13.1 | 4.1 |
| | 主枝先端区 | 2.7 | 424 | 13.2 | 4.1 |
| | 差异显著性 | — | — | ** | ** |

花、疏果、套袋、打药、采收等作业在离地 1.8 m 的主枝 2 侧进行,与现有技术以疏散分层形整形为主,树体高大离地达 2.5~3 m 相比,显得非常方便,且与现有技术相比生产用工成本节省 30% 以上。同时改进了的整形方法削弱了主枝的顶端优势,主枝两侧直接配备侧枝结果,不但成园早,与现有技术的从定植到树形培养成功需要花费 8~10 年时间相比,

的研究方法^[2,4-5],分别合成 Movi、Mccp、Mmc 引物各 1 对[由生工生物工程(上海)股份有限公司合成],详见表 1。基因组 DNA 快速抽提试剂盒(动物)、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl₂、10 × PCR Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、100 bp DNA Ladder、6 ×

表 1 山羊传染性胸膜肺炎主要病原支原体检测引物信息

| 支原体 | 引物序列 (5'→3') | 靶基因 位置 | 片段大小 (bp) |
|-------------------|--|-----------|--------------|
| 绵羊肺炎支原体(Movi) | 上游:TGAACGGAATATGTTAGCTT;下游:GACTTCATCTGCACTCTGT | 16S rRNA | 361 |
| 山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp) | 上游:ATCATTTTTTAATCCCTTCAAG;下游:TACTATGAGTAATTATAATATATGCAA | 16S rRNA | 316 |
| 丝状支原体山羊亚种(Mmc) | 上游:CGAAAGCGCTTACTGGCTTGTT;下游:TTGAGATTAGTCCCTTCACAG | 16S rRNA | 548 |

1.2 方法

1.2.1 疫情调查 通过询问座谈、现场调查、个体检查等方法开展疫情调查,掌握关于本次疫情的流行资料,为临床诊断及疫情防控奠定流行病学基础。

1.2.2 病理剖检 剖检明显具有咳嗽、呼吸困难症状的濒死羊及新鲜病死羊各 2 只,重点剖检呼吸系统。

1.2.3 病料采集及处理 采用无菌操作,在病变明显肺组织病健交界处取样,将其研碎,按 1∶4(体积比)加入无菌含双抗的 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。将处理好的病料置于 -20 ℃ 保存备用。

1.2.4 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:(1)3 000 r/min 10 min,取 200 μL 上清转移至新的 EP 管;(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 ℃ 5 min;(4)室温、10 000 r/min 5 min,取 500 μL 上清转移至新的 EP 管;(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 5 min,弃上清;(6)加 1 000 μL 75% 乙醇,颠倒漂洗 2 min,10 000 r/min 2 min,弃上清;(7)重复(6)1 次;(8)开盖,于室温倒置 5~10 min 左右;(9)加入 100~200 μL TE Buffer 溶解;(10)-20 ℃ 保存或立即进行下一步试验。

1.2.5 PCR 检测 Movi 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 × buffer、3 μL 25 mmol/L MgCl₂、1 μL 10 mmol/L dNTPs、各 1 μL 上下游引物、3 μL cDNA、1 μL *Taq* DNA 聚合酶,用灭菌超纯水补足至 50 μL。反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 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。

2 结果与分析

2.1 流行病学调查

该羊场自 2013 年 6 月中旬购进约 500 只波尔杂交肉山羊,进栏后,由于没有采取措施,从第 2 天开始陆续有羊死亡;直至 9 月中旬笔者所在课题组去羊场调研,依然不断有羊死亡,发病率超过 60%,病死率达 40%。病死羊临床上有发热、咳嗽、喘气、流泪、流鼻涕、拉稀、渐进性消瘦现象,用泰乐菌素、青霉素、氨基比林、恩诺沙星等予以治疗,效果不佳。整个羊场呈持续慢性感染,羊感染潜伏期长短不一,一般在 20 d 左右。随着病程延长,病情加重,病羊呼吸困难,腹式呼吸,呼

DNA 凝胶载入染料(Loading Dye)均为生工生物工程(上海)股份有限公司产品,其他试剂均为国产分析纯。病料来源于泰州市高港区某波尔杂交肉山羊场,初诊疑似山羊传染性胸膜肺炎感染病羊的病变肺组织、胸腔渗出液、心包积液等。

吸次数增加,频繁干咳或痉挛性咳嗽,头颈伸直,腰背拱起,呈痛苦状。叩诊肺部有浊音、实音区,对胸壁触压反应敏感。濒死病羊的体温可降至常温。

2.2 病理剖检结果

剖检病(死)羊(图 1)可见病变主要在胸部,胸腔内有大量淡黄色积液,肺胸膜因有大量的纤维索性渗出而增厚,心包积液,肺组织肝样变(图 2、图 3、图 4),有的在—侧,有的两侧均有,病变严重程度不一。严重者肺胸膜多与肋膜、心包膜粘连(图 4、图 5),需用手或刀剪才能将其分离。严重者肺肝变区机化,结缔组织增生,形成黄色较硬的坏死性包囊(图 6、图 7)。病变肺组织硬化部位切面呈大理石状(图 8)。有的病例肝脏肿大,胆囊肿大多汁,肾脏肿大,严重病例肠系膜淋巴结充血、出血、坏死(图 9)。

2.3 PCR 扩增结果

对病料进行 PCR 检测,仅得到 Movi 目的基因片段,片段大小为 361 bp(图 10),与预期的结果相符。

3 结论与讨论

本病例采用 PCR 技术检测时,虽然针对山羊传染性胸膜肺炎的 3 种主要支原体病原分别设计了绵羊肺炎支原体(Movi)、山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)、丝状支原体山羊亚种(Mmc)引物各 1 对,但在实际检测中,仅检测到绵羊肺炎支原体(Movi),说明绵羊肺炎支原体(Movi)在临床上是可以单独对山羊致病的,而且会呈现山羊传染性胸膜肺炎的典型临床症状和病理变化,这与前人研究结果^[2-3,6]一致。支原体的分离与培养均较为困难,各种支原体引起的山羊临床症状和病理变化仅凭肉眼难以区分,基层兽医力量薄弱、技术不够完善,这些都是造成山羊传染性胸膜肺炎临床上难以及时有效诊治的原因,PCR 技术可以在临床上快速检测支原体,避免因分离不到病原而错失对山羊传染性胸膜肺炎的准确诊断,非常适合应用于山羊养殖生产实际。

本研究结果表明,该羊群发生传染性胸膜肺炎的主要原因有几个方面:一是发病羊群进场未经引入检疫和隔离观察即进栏饲养,如果羊携带山羊传染性胸膜肺炎病原,就造成了人为引入病原,实际上引进隐性感染羊或发病羊是不少羊场发生该病的主要原因。二是进场后未采取积极的防控措施,这是许多羊场引进羊 1 周内大量发病的重要因素。正确的做法是:利用 1 周时间循序渐进地更换饲料,给予一定的抗菌药物,让羊在新环境下逐渐适应,避免因水土不服而拉稀、腹泻,降低抗病能力;了解羊在原场的免疫程序,在羊健康的情况下,适时接种疫苗,做到科学免疫。羊场一旦发病,应及时求



图1 病死羊消瘦、昂头、腰背拱起

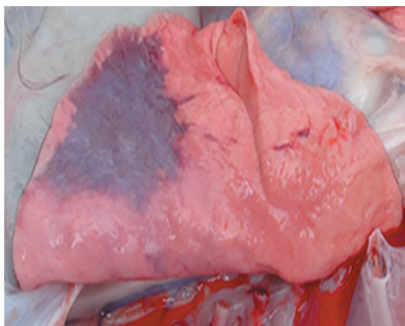


图2 后叶肺组织肋面肝样变

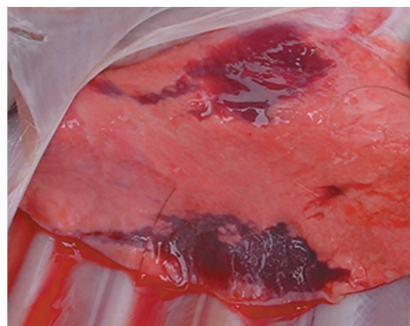


图3 胸膜肺炎肺组织轻度肝样变

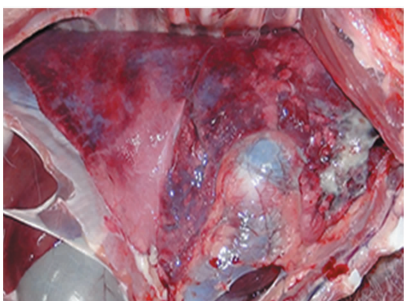


图4 肺肝样变, 肺胸膜与心包膜粘连



图5 心包膜、肺胸膜与肋膜粘连

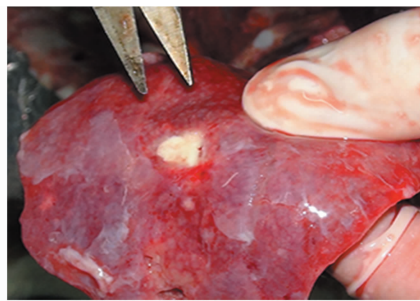


图6 肝样变肺组织机化包裹

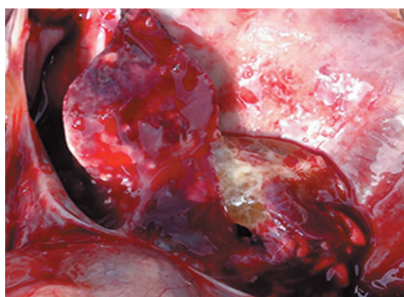


图7 纤维素性胸膜肺炎肺组织硬化

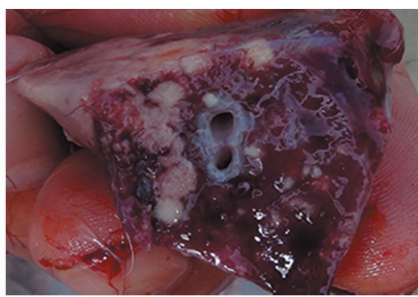
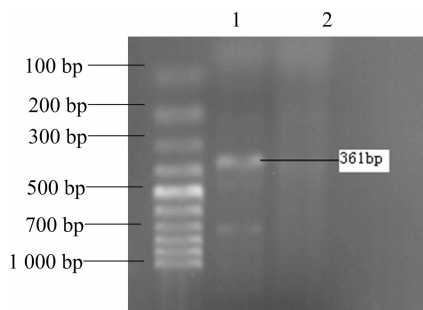


图8 肝样变肺组织切面大理石状



图9 肠系膜淋巴结坏死、胸水充盈



M—100 bp DNA Ladder; 1—病料; 2—水

图10 部分病料Movi检测电泳结果

助兽医部门或相关科研机构,争取及早确诊,科学合理治疗,避免误诊误治、延误病情而导致惨重损失。

由于山羊传染性胸膜肺炎的病原支原体具有多样性,不同地区分离的优势病原菌株也各有不同,这给该病的预防、控制增加了困难。绵羊肺炎支原体多呈慢性感染,病程长且不易发觉,病情严重后往往难以取得理想疗效,因此应重视该病的多举措预防。目前的山羊传染性胸膜肺炎疫苗,主要以Mmc制备,尚没有采用Movi制备的专用疫苗,因此用传统疫苗免疫该病尚不理想,需要尽快研制具有地方针对性的优质

疫苗用于生产实践中对该病的高效预防^[7]。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该场的自家苗用于紧急预防。

参考文献:

- [1] MacMartin D A, MacOwan K J, Swift L L. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: From original description to aetiology[J]. Br Vet J, 1980, 136(5): 507-515.
- [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] 杜永凤, 文心田, 曹三杰, 等. 山羊传染性胸膜肺炎病原分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(6): 618-621.
- [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] 赵萍, 郭 晗, 储岳峰, 等. 山羊传染性胸膜肺炎病原的检测[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(2): 340-341.
- [6] 毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 83-91.
- [7] 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.