



CHICK
PROGRAM

总第15期/2014年5月

伊拉克不同地区传染性支气管炎病毒分子流行病学检测及其 与禽流感病毒（H9）和鸡毒支原体之间的关系

摘要

传染性支气管炎病毒（IBV），禽流感病毒（AIV）和鸡毒支原体（MG）已经被确认为伊拉克和世界各地的多个其他国家的家禽养殖业中最重要的急性呼吸道感染病原体，并可以导致严重的经济问题。本研究旨在通过定量PCR研究这些疾病在伊拉克中部不同地区的商业鸡群中的分布情况。在2010年11月至2011年6月期间，我们采集了来自38个不同的商业肉鸡群临床病例(Najaf, Hilla, Muthana和Theqaar省)的气管拭子和气管，肺和肾脏的组织样本，这些鸡群都表现出呼吸道症状，死亡率约为20-90%。结果表明，92.1%的鸡群采集样本IBV感染阳性，20%的样品单独感染IB，45.71%的样品为IB与MG和AIV H9亚型的混合感染，25.71%的样品IBV和AIV（H9）同时为阳性。没有样品单独感染AIV（H9）或MG。因为呼吸系统疾病在伊拉克商业鸡群中十分普遍，而且以前没有关于通过分子生物学技术检测该病原体的研究，本研究通过定量PCR检测并确认了该病原体的诊断，属于伊拉克用于这一领域的新技术。

简介

禽类呼吸道疾病的病因是复杂的，往往同时涉及多个病原体，包括禽肺病毒（APV），禽流感病毒（AIV），传染性支气管炎病毒（IBV），新城疫病毒（NDV）和鸡毒支原体（MG），而这些呼吸道病原体都具有重大意义，因为它们可能会导致单独感染或与其他细菌或病毒混合感染（1）。

传染性支气管炎（IB）是一种急性、高度传染性的呼吸道疾病，其中一些可引起鸡群的泌尿生殖系统疾病，并导致家禽养殖业显著的经济损失（2）。感染可能存在或不存在呼吸道症状（3,4）。已经开发出各种疫苗和防控程序来控制这种病毒性疾病，但该疾病是难以控制的，因为病毒的不同血清型之间不存在交叉保护，免疫失败往往与不同于疫苗病毒抗原性的突变株的出现有关，并且本病的严重程度在地区之间和鸡群之间各不相同（5）。



CHICK PROGRAM

禽流感(AI)是一种蔓延全球的病毒性疾病,由A型流感病毒引起,H9N2血清型的禽流感病毒不是高致病性禽流感(HPAI)病毒,但已经造成了肉鸡的严重感染(6)。在免疫抑制鸡群中能够导致严重的呼吸道感染,并导致雏鸡的高死亡率(7)。禽流感病毒(AIV)存在大量亚型(8)。尽管大多数禽流感病毒只引起鸡的呼吸道和肠道的轻度和局部感染。自2008年以来,通过分子技术检测显示,在Najaf省的家禽中已报道了禽流感H9亚型的出现(9)。

尽管支原体是非自然致病的,一些研究者提出了这种细菌的致病作用,可能使家禽出现慢性呼吸系统疾病,特别是在存在管理压力或伴有其它呼吸道病原体感染的情况下。已经发表的研究中报道了鸡毒支原体与家禽呼吸道疾病的关系,它似乎是作为致病性呼吸道病毒的一个辅助因子,包括新城疫病毒和传染性支气管炎病毒(10,11)。免疫接种后的应激可导致鸡毒支原体诱发肉鸡的气囊炎(12)。

因此,在野外条件下很难对这些疾病进行区分,必须迅速和精确地检测到感染鸡群中病毒的存在,以便后续鸡群可以进行适当的疫苗接种。同样重要的是迅速地将IBV感染与其他上呼吸道疾病如禽流感、新城疫、禽支原体进行区别(9,13),尤其是这些疾病可直接或间接地传播。因此,可以及时采取适当措施来防御这些疾病。

通过分子生物学方法检测IBV等呼吸系统疾病十分常用,因为它们可及时提供高度特异和灵敏的结果,目前,反转录PCR(RT-PCR)通常根据病毒的遗传物质用于诊断病毒感染,而其它传统技术如鸡胚接种、气管环培养或细胞培养免疫实验来分离病毒(14)。利用RT-PCR,从临床样品如气管、肾或泄殖腔拭子中直接检测到IBV(15),使用Taqman探针从现场样品中检测IBV(16)。本研究的目的是采用实时PCR法从免疫肉鸡群中检测IB病毒的RNA。并与上呼吸道感染症状类似的病毒,如禽流感和支原体感染进行区分,这些都是需要优先考虑的病原。因此,能够快速诊断IBV十分重要,这样我们就可以判断IBV是否是上呼吸道疾病爆发的原因。

材料和方法

在2010年11月至2011年6月期间,共有38例表现出呼吸道症状的来自不同鸡群的临床病例,从伊拉克中部不同地区(Najaf, Hilla, Muthana 和 Theqaar省)被送到Najaf动物医院的实验室,大体病变表现为气管存在浆液性、卡他性或干酪样渗出物,气囊黄色干酪样渗出,鼻腔出现分泌物,肾型病例出现肠道充血,肾脏苍白肿大,尿酸盐沉积,所有这些鸡群都进行了常规疫苗接种,包括新城疫和禽流感H9N2亚型油苗注射,IB(H120或MA5或4/91)气雾免疫或1日龄滴鼻点眼接种。在7日龄进行弱毒ND免疫(clone30),在14天日龄接种中等偏强毒力IBD疫苗。另一方面,有些肉鸡在两周龄后通过点眼重新接种IBV疫苗。一些肉鸡鸡群没有接种IBV和禽流感H9N2亚型疫苗,但在7,18,30日龄通过饮水免疫ND减毒活疫苗,并在7日龄和14日



CHICK PROGRAM

龄接种中等毒力的鸡传染性法氏囊病疫苗（D78）。这些鸡群在20日龄或以上出现呼吸系统疾病，20日龄以下鸡群很少出现症状。采集气管，肺，肾和气管拭子以供实验室诊断。

气管拭子放置于1.0ml生理盐水中，10000rpm离心10分钟，弃去上清液，根据提取试剂盒说明书对沉淀进行处理（Bionote，韩国）。

制备组织标本的方法是，将1克组织（气管，肺，肾）与1.0ml生理盐水进行机械匀浆，随后将匀浆在室温下高速离心30分钟，然后将上清液转移到一个新的1.5 ml微量离心管中（ Sacace ，意大利）。

RNA和DNA提取

每个鸡群使用150 μ L准备好的样品根据制造商的说明进行RNA纯化和RNA的提取（AniGen病毒RNA纯化试剂盒，Bionote，韩国），使用100 μ L的制备样品进行DNA提取（Myc-Gal兽医试剂盒，Sacace，意大利）。根据制造商的说明，采用一步实时荧光定量PCR试剂盒检测IBV和H9亚型病毒（H9与IBV实时检测试剂盒，Bionote，韩国），采用Real-Time PCR试剂盒检测支原体（MYCO G / S实时检测试剂盒，Bionote，韩国）。每个鸡群进行3次重复。对于H9和IBV，根据制造商的说明，使用Real-Time RT-PCR检测试剂盒通过不同的程序对其进行检测。每次检测都设立阳性和阴性对照。（具体步骤略）

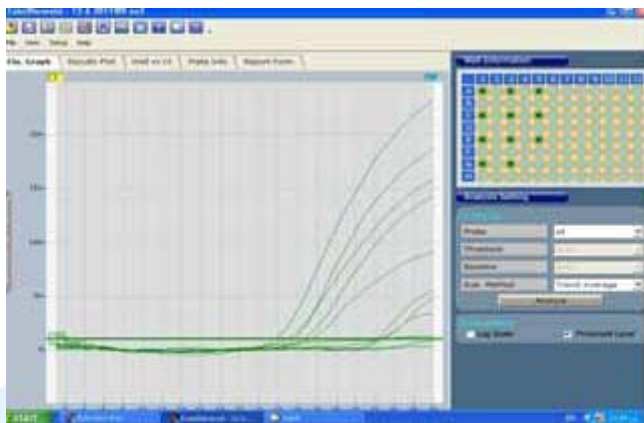
结果

这项研究的结果表明，这些鸡群中的35/38（92.1%）的样品感染了IBV，其中7/ 35（20.0%）的样品单纯感染IBV，16/35（45.71%）的样品为IBV，禽流感病毒和MG混合感染，2/35（5.71%）阳性样本同时感染IBV和AIV，9/35（25.71%）的样品同时感染IBV和MG，没有样本呈禽流感病毒或MG单纯感染阳性。另一方面，3/38（7.9%）的样品显示上述呼吸道疾病病原体阴性。（表1，图1）。

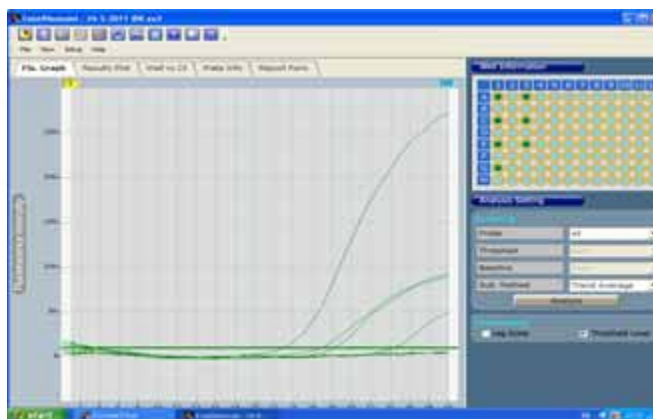


鸡计划

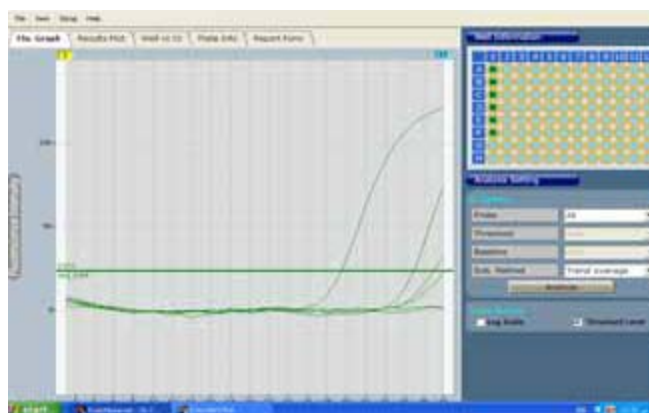
CHICK PROGRAM



A



B



C

图1: 荧光曲线图(FAM day) A) H9病毒; B) IB 病毒 C) 鸡毒支原体.(实时PCR 软件, Bioneer, Korea)



CHICK PROGRAM

表1 研究样本中IB、H9AIV和MG的分布情况

Sample No	MG [†]	H9 [†]	IB [△]
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	+
8	-	-	+
9	+	+	+
10	-	-	+
11	+	+	+
12	-	-	+
13	+	+	+
14	+	-	+
15	+	+	+
16	-	-	-
17	-	+	+
18	-	-	+
19	+	-	+
20	+	+	+
21	-	-	+
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	+
28	-	-	+
29	+	-	+
30	-	-	-
31	+	-	+
32	+	-	+
33	+	-	+
34	-	-	-
35	+	-	+
36	+	+	+
37	+	-	+
38	-	+	+



**CHICK
PROGRAM**

讨论

传染性支气管炎病毒和禽流感H9亚型病毒在伊拉克的地方性感染特点，造成了过去几年肉鸡养殖业严重的经济损失，而且仍在继续。在临床上不可能将传染性支气管炎（IB）与禽流感（AVI）和新城疫（NDV）所造成的上呼吸道感染进行区分。因此，有必要通过某些特定的实验室试验来诊断禽流感和IB病毒的影响，特别是如果我们知道呼吸道疾病的病因是复杂的，往往涉及一个以上的病原体（1）。在伊拉克，大多数情况下，往往根据临床症状和大体病变对IBV感染进行诊断，这主要是因为家禽诊断实验室资源十分有限，同样的，其他呼吸道病原体被排除在呼吸系统疾病的病因之外。

本研究的结果与约旦的Roussan的研究¹⁷并不相同，他发现15.7 %的样本同时感染IB和禽流感病毒，10.4 %的样本感染IB和MG，阴性样品的百分比为11.3 %。另外，IB感染在约旦的研究中的分离率超过64 %（18）。本研究显示IB病毒感染的严重性在伊拉克具有地方性区别，而且在临床上它与MG的关系比与禽流感关系更大，这与约旦的研究结果不同（17），本地区的高温环境和管理水平差，以及IB和ND的频繁免疫，可能会作为一种应激因素刺激MG在鸡群中呈地方性流行，解释了本研究与其他研究之间的分离率的差异。

在急性呼吸道感染的情况下，气管会存在大量的病毒，所以它是用于病毒检测的首选组织（19,20）。通过RT-PCR检测的某些鸡群在2周龄内接种了IBV疫苗；但免疫鸡群和非免疫鸡群都检测到了呼吸系统疾病的临床症状。因此，通过RT-PCR检测到IBV表明，这些鸡群之前接触过IBV，排除了所检测到的IBV是由于疫苗接种的可能性（21,22）。

尽管这些省份的家禽养殖场使用了三种不同的疫苗（H120，MA5，4/91），仍然可以观察到呼吸型、肾型病变的疫情爆发，而且导致肉鸡养殖场的死亡率居高不下。由于免疫鸡群仍然发生IBV的爆发，而且病毒分离株与所使用疫苗株的血清型经常不同（23-25），持续对病毒进行基因型的确认以及生产新一代疫苗是至关重要的。

从该地区分离到的H9N2禽流感病毒说明了其致病潜力，因此，这些病毒可能是未来潜在的起源于亚洲的人类流感大流行的病原（13），因此应采用定量PCR技术对该地区的活禽市场进行全面监控，以评估某一特定领域的禽流感各种血清型的组成。这些鸡群的呼吸系统疾病可能由其他呼吸道病原体如鸡毒支原体造成，或由管理因素引起。但是，判定呼吸系统疾病的确切原因，除了上述的呼吸道病原体（H9 & IB）之外，本研究还很不足，比这更重要的是获得野外分离株的序列，最终有可能在序列数据的基础上筛选出新的疫苗株。

目前的研究清楚显示，本研究地区的商品鸡群中传染性支气管炎的流行率相对较高。通过使用分子生物学诊断技术如定量PCR等，可以对该疾病所造成的经济影响进行全面、详细的分子流行病学研究。未来的研究应致力于对该地区的传染性支气管炎病毒进行基因分型，以便选择更适宜的免疫程序，以及使用普遍流行的野毒株基因型作为疫苗候选。