

## 小鹅瘟的诊断及其病理组织学观察

王浩, 张烁, 刘红梅\*, 潘玲\*, 祁克宗

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 对3例疑似小鹅瘟感染病禽进行临床观察和病理解剖, 结果均发现小肠中后段膨大, 小肠末端形成特征性的“肠栓”。针对鹅细小病毒 VP3 基因设计1对引物, 对3例病死鹅的肝脏组织进行PCR检测, 结果均扩增出与预期结果一致的331 bp 鹅细小病毒特异片段; 取病死禽的十二指肠、回肠、心、肝、脾、肾等组织制作石蜡切片, HE染色, 进行病理组织学观察, 结果显示其十二指肠肠绒毛脱落, 回肠粘膜大片坏死脱落并与纤维索性渗出物混杂形成栓子, 其他部位病变不明显。皖西白鹅还表现肝组织淤血、肝细胞脂肪变性, 肾脏肾上皮细胞变性、坏死, 淋巴细胞浸润。

**关键词:** 小鹅瘟; 诊断; PCR; 病理观察

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)06-0859-04

### Diagnosis of gosling plague and its histopathologic observation

WANG Hao, ZHANG Shuo, LIU Hong-mei, PAN Ling, Qi Ke-zong

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Three dead goslings, which were suspected to be infected with goose parvovirus (GPV), were diagnosed by clinical observation and pathological anatomy. The results indicated that a swollen appearance appeared in the middle or lower parts of the small intestine and a typical coagulative embolus emerged and blocked the intestinal cavity. Based on the published VP3 sequence of GPV, a pair of specific primers was designed to amplify the nucleic acids of GPV by PCR, and specific bands of 331 bp in length agreed with the desired results of GPV-VP3 were amplified from three goslings liver tissues. The organization, such as duodenum, ileum, kidney, spleen and liver were analyzed by taken into 10% formaldehyde solution, paraffin embedding, HE dyeing and histologic analysis. The results showed that the fibrinous necrotic enteritis could be observed in duodenum and ileum, and the cellular morphology of other tissues were good in three cases. For Wanxi white goose, degeneration, necrosis could be observed in renal epithelial cells and the congestion, and steatosis could be observed in liver tissue and cells.

**Key words:** gosling plague; diagnosis; PCR; pathological observation

小鹅瘟又称 Derzsy's 病、小鹅病毒性肠炎、鹅细小病毒感染等, 是由鹅细小病毒 (Goose parvovirus, GPV) 引起的一种急性或亚急性雏鹅和雏番鸭败血性传染病, 主要侵害 3~20 日龄小鹅, 传染速度快、死亡率高。该病临床以严重下痢以及渗出性肠炎为特征, 剖检特征性病理变化为空肠和回肠的急性卡他性—纤维索性坏死性肠炎, 形成栓子堵塞肠腔。1956 年, 我国方定一教授首次在江苏省扬州

地区发现该病并命名, 目前已扩展至全国 20 多个省市<sup>[1-3]</sup>。近些年来, 安徽省养鹅产业发展迅猛, 鹅病发生种类较多, 对养鹅业发展产生影响, 鹅病防治显得尤为重要。小鹅瘟是安徽省水禽常见疫病之一, 许多地方已经使用疫苗进行预防, 但疫情仍不断发生。如何对小鹅瘟病进行综合性诊断, 进而采取有效防治措施, 值得有关部门和养殖专业户重视。

笔者于 2011 年 4~5 月收集 3 例疑似小鹅瘟病

收稿日期: 2012-05-21

基金项目: 安徽农业大学博士启动基金和安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (KJ2012A112) 共同资助。

作者简介: 王浩, 男, 硕士研究生。E-mail: 418106517@qq.com

\* 通讯作者: 刘红梅, 女, 副教授。E-mail: liu2844707@sina.com

潘玲, 女, 副教授。E-mail: lingpan08@ahau.edu.cn

例,分别记录临床症状,进行病理剖检;针对 GPV 的 VP3 基因,设计引物对 3 例病死禽的肝脏组织进行 PCR 检测,取部分组织制作石蜡切片进行病理组织学观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验动物:来源于安农大畜禽疾病诊断室 3 例疑似小鹅瘟病例,品种分别为安徽利辛土鹅(病例 1)、太湖番鸭(病例 2)、肥西皖西白鹅(病例 3)。除番鸭外,均按正常免疫程序免疫过小鹅瘟疫苗,发病在 15~30 日龄,死亡率 10%~90%。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品采集与固定** 分别对收集到的病禽进行临床观察和病理剖检,记录病理症状;采集肠道、肝脏等组织脏器,放入 4℃ 冰箱中保存,以便用于 PCR 检测;采集心脏、肝脏、脾脏、肾脏、腺胃、小肠等器官组织,用 10% 中性福尔马林固定。

**1.2.2 PCR 诊断** 引物设计参考相关文献<sup>[4-5]</sup>,并根据 GenBank 登陆的 GPV 及番鸭细小病毒 VP3 基因序列,利用 DNASTAR 软件设计 1 对引物,引物由大连宝生物工程有限公司合成。病毒 DNA 提取按照基因组 DNA 抽提试剂盒(购自大连宝生物工程有限公司)说明书进行,然后进行 PCR 检测。PCR 反应条件:96℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,54℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 40 s,共 30 个循环;最后 72℃ 后延伸 10 min,扩增结束后,2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,同时设置 GPV 阳性 DNA 为对照。

**1.2.3 病理组织切片的制备** 对中性福尔马林固定的样品依次按照冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋等过程制备石蜡切片,染色后在显微镜下观察病理组织学变化并拍摄照片。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床剖检结果

3 个临床病例观察结果共同点:小肠后端膨大增粗,大概是正常体积的 1~3 倍,肠壁变薄,触摸有紧实感,外观如香肠状,剪开肠段发现里面有暗红色或者黄绿色栓塞(图 1-A,图 1-B),栓塞物不与肠道粘连,易从肠腔中拖出,肠壁完整,但粘膜表面明显充血、出血。此外,皖西白鹅的肝脏有少量出血点,肾脏有白色点状结节。

### 2.2 PCR 检测结果

利用 GPV 引物对 3 例病死鹅肝脏组织进行 PCR 检测,均扩增出与阳性对照一致的 331 bp 特异片段

(如图 2)。

### 2.3 病理组织学观察

3 个病例的主要病理组织学病变在小肠,除了皖西白鹅表现肝脏和肾脏的病变外,脾脏、心脏、腺胃等组织均未见明显组织学病变。

**2.3.1 十二指肠** 3 个病例的十二指肠粘膜绒毛脱落、坏死,肠腔中有成片脱落粘膜上皮(图 1-C),十二指肠深层腺管结构破坏,呈中空状。

**2.3.2 回肠** 3 个病例均呈典型纤维素性坏死性肠炎:坏死粘膜及纤维素性渗出物凝固形成假膜脱落入肠腔,脱落面平整(图 1-D);肠绒毛完全脱落,小肠腺坏死,剩下空囊状的残痕,少数残存的肠腺腺腔扩大(图 1-E);肠中栓塞物主要由坏死、脱落、崩解的肠粘膜组织凝固而成,其中混有红色网状的纤维素性渗出物和炎性细胞(图 1-F, G)。

**2.3.3 肝脏和肾脏** 皖西白鹅肝脏组织间隙有多量红细胞,肝细胞脂肪变性较严重(图 1-H);肾组织表现肾小管上皮细胞变性、坏死,肾小管管腔为坏死细胞,组织间隙有少量淋巴细胞浸润(图 1-I)。

## 3 讨论

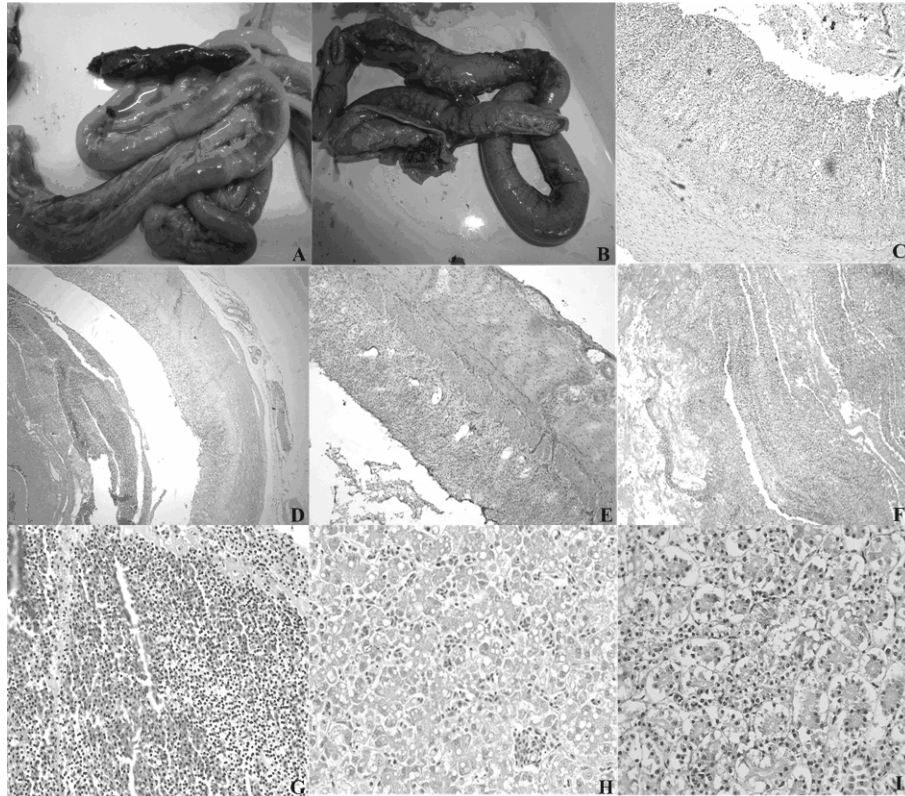
结合流行病学特点、临床表现、剖检特征以及核酸检测,可以诊断 3 个临床病例均为 GPV 感染。目前,用于实验室诊断小鹅瘟的方法较多,如病毒的分离鉴定、琼脂扩散试验和 ELISA 试验等<sup>[6-8]</sup>,这些方法各自有一定的优缺点,其中 PCR 检测方法具有敏感性高、特异性强、操作简单快速的优点,因而普遍应用于实验室鉴别诊断。值得注意的是,在诊断番鸭小鹅瘟病时,由于番鸭小鹅瘟病与番鸭细小病毒病在临床上容易混淆,且二者的病毒核酸序列有很高同源性,因此 PCR 引物设计非常关键。

3 个病例中有 2 个已经接受过小鹅瘟的免疫,但依然发病,说明小鹅瘟疫苗的免疫程序或方法不正确或免疫不确实。比较 3 个临床病例,太湖番鸭发病时间最短,死亡率最高,这可能跟番鸭没有进行小鹅瘟免疫有关。已知 GPV 主要感染鹅(白鹅、雪鹅、雁鹅、灰鹅、狮头鹅等)和个别品种的鸭(番鸭、莫斯科鸭),这提示饲养中切忌鸭鹅混养,还要加强番鸭的小鹅瘟免疫,并注意该病毒在鹅和鸭之间的传播。

从临床解剖和组织病理两方面来看,3 个病例均有小鹅瘟特征性的病变—肠道栓塞,从十二指肠到回肠均有由纤维素性渗出物和炎性细胞等成分组成的栓子。皖西白鹅还表现出肝脏和肾脏的严重病变,虽然免疫过小鹅瘟,但其死亡率高于利辛土鹅,

肝脏和肾脏的病变有可能是 GPV 感染后所致,也有可能在组织发生严重损伤情况下其对 GPV 的易感

性增强所致,这提示平时要加强饲养管理,搞好环境卫生,禁止饲喂霉变饲料和滥用药物。

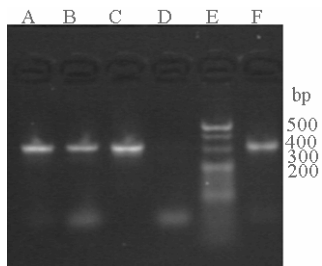


A. 肠道暗红色栓塞, B. 肠段膨大和黄绿色栓塞, C. 十二指肠粘膜绒毛脱落、坏死, 管腔内有坏死脱落物质 (HE,  $\times 100$ ), D. 回肠粘膜坏死及纤维索性渗出物凝固形成假膜脱落入肠腔, 脱落面平整 (HE,  $\times 100$ ), E. 回肠肠绒毛完全脱落, 小肠腺坏死, 腺腔扩大 (HE,  $\times 100$ ), F. 回肠中栓塞物主要由坏死的粘膜组织发生凝固和脱落物形成, 其中混有丝状的纤维索性渗出物和炎性细胞 (HE,  $\times 100$ ), G. 图 F 放大, 示纤维素、坏死细胞、炎性细胞 (HE,  $\times 400$ ), H. 肝组织淤血, 肝细胞脂肪变性 (HE,  $\times 400$ ), I. 肾组织肾小管上皮细胞变性、坏死、少量淋巴细胞浸润 (HE,  $\times 400$ )

A. Dark red embolus in intestine; B. Swelling intestine and yellow-green embolus in intestine; C. Necrosis and abscission of duodenal villi, necrotic material remained in duodenal lumen (HE,  $\times 100$ ); D. Fibrinous pseudomembrane made from the necrotic ileum mucosal and fibrinous exudate, dropped into ileal lumen, and the separated surface was smooth (HE,  $\times 100$ ); E. Abscission of ileum villi completely, necrosis of intestinal gland, expansion of gland cavity (HE,  $\times 100$ ); F. Embolus in ileum mainly consists of necrotic mucosal tissue coagulation, shedding and filamentous fibrinous exudate and inflammatory cells. (HE,  $\times 100$ ); G. Enlarged figure F, showed fibrin, necrotic cells, inflammatory cells (HE,  $\times 400$ ); H. Congestion in liver tissue, with hepatic steatosis (HE,  $\times 400$ ); I. Degeneration and necrosis in renal tubular epithelial cell, a small amount of lymphocytic infiltration in renal tissue (HE,  $\times 400$ )

图 1 肠道栓塞及各组织的病理组织学变化

Figure 1 Coagulative embolus in small intestine and histopathological changes from goslings infected with GPV



A-C. 病例 1-3 的 PCR 产物; D. 阴性对照; E. 20 bp Marker; F. 阳性对照

A-C. PCR products from three cases; D. Negative control; E. 20 bp Marker; F. Positive control

图 2 病禽肝脏 GPV-VP3 的 PCR 产物

Figure 2 PCR products of GPV-VP3 gene from liver tissues of three goslings

小鹅瘟主要通过消化道传播,成年鹅感染后无临床症状而成为带毒者,并可经卵将疾病垂直传播给下一代。在每年全部更新种鹅的地区,该病的爆发与流行具有明显的周期性。因此,对已经感染此病的养殖场要彻底消毒,消除病因。由于小鹅瘟主要发生于雏鹅,以 5~15 日龄的雏鹅发病最多,因此对该病的预防宜采取母鹅疫苗免疫和雏鹅高免血清预防相结合的措施,特别是个体种鹅养殖户,具体操作为:母鹅在产蛋前 30~35 d 用小鹅瘟疫苗免疫,在产蛋后期可配合免疫抗体检测结果加强免疫,严格按使用说明书规定进行稀释和接种;若不了解母鹅免疫情况,1~2 日龄雏鹅尽快用抗小鹅瘟病毒

高免血清预防（若用于治疗时剂量加倍）。

### 参考文献:

- [1] Gough T D, Ceeraz V, Cox B, et al. Isolation and identification of goose parvovirus in the UK[J]. *Vet Rec*, 2005, 156(13): 424.
- [2] 程晓霞, 陈少莺, 朱小丽, 等. 番鸭小鹅瘟病毒的分离与鉴定[J]. *福建农业学报*, 2008, 23(4): 355-358.
- [3] Janssen D S, Feinstein R, Kardi V, et al. Epidemiologic investigation of an outbreak of goose parvovirus infection in Sweden [J]. *Avian Dis*, 2007, 51(2): 609-613.
- [4] 胡桂学, 逢博, 高凤山, 等. 小鹅瘟 PCR 诊断方法的建立和初步应用[J]. *经济动物学报*, 2003, 7(2): 50-53.
- [5] 王彬, 孙德君, 柴华. 小鹅瘟病毒 H 株 VP3 基因序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(10): 155-158.
- [6] 汪开毓. 人工感染小鹅瘟的病理形态学研究[J]. *四川农业大学学报*, 1997, 15(2): 255-262.
- [7] 布日额, 李宝臣, 马波, 等. 应用 GPV VP3 基因重组原核表达产物建立检测抗体的 ELISA 方法研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(2): 199-203.
- [8] 黄诚, 程安春, 汪铭书, 等. 鹅细小病毒强毒 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2004, 34(9): 54-60.

## 本刊顾问 李家洋院士

李家洋, 植物分子遗传学家, 中国科学院院士, 研究员。1956年7月出生于安徽肥西。1982年毕业于安徽农学院(现安徽农业大学), 1991年获美国布兰代斯(Brandeis)大学博士学位, 1991-1994年在美国康乃尔大学汤普逊(Boyce Thompson)植物研究所进行博士后研究工作。历任中国科学院遗传研究所所长助理、所长, 遗传与发育生物学研究所所长。

李家洋主要从事植物分子遗传学研究, 他利用模式植物拟南芥与重要粮食作物水稻探索植物生长发育的调控机理。近年来的主要研究工作包括: 采用图位法克隆了水稻分蘖控制基因 MOC1, 开拓了水稻分蘖控制分子机理研究的新领域; 利用水稻脆秆突变体分离了 BC1 基因, 阐述了水稻机械强度的控制机理; 通过获得的拟南芥胆碱生物合成突变体, 初步明确了胆碱合成与植物温度敏感雄性不育性的关系; 通过图位克隆法分离出导致细胞死亡的基因 MOD1, 明确了初级代谢途径的缺陷会导致植物细胞凋亡; 利用转基因技术, 创制出色氨酸与吲哚乙酸合成量改变的转基因植物, 从而提出植物生长素吲哚乙酸生物合成途径的新模式; 建立了一种简易的基因芯片体系, 鉴定出一批油菜素内酯的应答基因, 并证实了油菜素内酯对植物细胞分裂的促进作用; 发展了系统鉴定植物功能基因的植物表达文库转化法, 分离出一批株型与育性等生长发育性状改变的拟南芥突变体, 克隆了相关的基因。

自1999年担任遗传研究所所长以来, 通过加强与所领导班子成员团结、积极引进和培养优秀科研人才、强化规章制度建设与行政管理工作的公开公平公正、创造出一种宽松和谐与人人奋发进取的科研环境, 促进了研究所的迅速发展。

2004年1月, 李家洋任中国科学院副院长、党组成员。

2011年5月, 李家洋被增选为美国国家科学院(NAS)外籍院士。

2011年10月, 李家洋任农业部党组成员、副部长和中国农业科学院院长。