

鸡病毒性腺胃炎多因子致病机理的研究*

THE MULTI-FACTORS PATHOGENESIS OF CHICKEN VIRAL PROVENTRICULITIS

褚艳丽¹, 刘思当²

(1. 山东省莱芜市畜牧局, 莱芜 271100; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 本研究通过致腺胃炎病毒、腺胃炎相关病毒及腺胃炎诱发病毒的两重或多重混合感染, 建立鸡病毒性腺胃炎多因子致病模型。试验所用病毒为腺胃炎 QX 株、REV、FPV、IBDV 强毒疫苗。试验设计为 1 日龄 SPF 雏鸡随机分为 8 组, 一组为对照组(C 组), 其余为腺胃炎病毒单独感染或与不同病毒共感染组, 通过几种病毒的混合感染, 成功复制出了腺胃炎病例。以免疫组化、H.E. 染色对各试验组鸡免疫器官淋巴细胞的凋亡进行了形态学研究, 发现各病毒感染组都能引起较明显的淋巴细胞凋亡, 凋亡主要见于感染早期。对各攻毒组免疫器官和腺胃、小肠以及部分内脏器官(肝、肾、肺、心肌、脑等)进行了动态病理学研究, 结果表明: 病理损伤以 4 种病毒共感染组最重, QX 株感染组最轻。实验结果表明: 其他致病因子能显著增强腺胃炎病毒的致病作用, 可造成体质减弱、免疫功能降低以及腺胃局部病变。这也是其他致病因子诱发或促进病毒性腺胃炎的主要原因。

关键词: 病毒性腺胃炎; 多因子; 致病机理

鸡病毒性腺胃炎(chicken viral proventriculitis, CVP)是一种以腺胃肿大为主要特征的新发生的传染病^[1]。该病在国内外均有报道, 近年来, 本病在我国广泛流行。鸡病毒性腺胃炎多发生于秋冬季节, 不同品种的鸡均可发生, 但以蛋鸡发病较多, 且较为严重。25 日龄~50 日龄鸡最易感, 病程 10d~15d。该病的发病率高, 一般为 7%~28%, 有时可高达 100%, 病死率可达 30%~75%^[2]。病鸡精神沉郁, 饮食减少, 体重逐渐下降, 发病中后期病鸡极度消瘦、苍白, 最后因衰竭而死, 给养禽业造成了巨大的经济损失^[3]。因此, 随着该病的进一步流行, 对本病的研究具有重大的理论意义和应用价值。

由于单独利用已分离鉴定的致腺胃炎病毒复制该病不易成功, 故本研究在探讨病毒性腺胃炎的发病原因时, 充分考虑到了本病发生的复杂性, 结合临床病例的实际发病情况, 从新的角度科学设计病毒性腺胃炎的多因素致病模型, 希望能够成功复制此病, 以证明该病属多因子所致疾病。此外, 进一步探讨病毒性腺胃炎多因子协同作用的致病机制, 为该病的防治提供病理学理论基础, 同时也为其他多因素疾病的病因学及发病学研究提供一个良好的范例。

1 材料和方法

1.1 试验病毒

试验用病毒有腺胃型传支 QX 株, 中国农业部动检所提供; 网状内皮组织增殖症病毒山东分离株 SD9901, 由山东省畜禽疫病防治工程技术研究中心提供; 鸡痘病毒, 由齐鲁制药动保中心提供; 法氏囊强毒组织苗, 由河北农业大学提供。

1.2 试验动物饲养管理

1 日龄 SPF 雏鸡 160 只全部饲养于封闭试验动物房中, 供给全价饲料, 自由饮水和采食。光照制度和其它管理措施参照蛋鸡饲养管理手册。

1.3 多因子致病模型的建立

按照随机分组的原则, 将 160 只 SPF 雏鸡随机分为 8 组, 每组 20 只, 其中一组作为对照组, 各组的饲养管理、光照制度完全相同。试验分组如下:

C 组: 空白对照组

Q 组: QX 株单独感染组(1 日龄攻毒)

QR 组: QX 株与 REV 混合感染组(1 日龄)

QF 组: QX 株单独感染(1 日龄), 再感染 FPV 组(21 日龄)

* 收稿日期: 2005-06-20

作者简介: 褚艳丽(1979-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事基础病理学及分子病理学研究。

QI 组: QX 株单独感染(1 日龄)与 IBDV 强毒疫苗免疫组(14 日龄)

QRF 组: QX 株、REV 混合感染(1 日龄), 再感染 FPV 组(21 日龄)

QRI 组: QX 株、REV 混合感染(1 日龄)与 IBDV 强毒疫苗免疫组(14 日龄)

QRIF 组: QX 株、REV 混合感染(1 日龄), IBDV 强毒疫苗免疫(14 日龄), 再感染 FPV 组(21 日龄)

其中, QX 株、REV 采用腹腔注射, IBDV 采用点眼滴鼻, FPV 采用翅下刺种。对上述各组定期(14、21、42、60 日龄)剖杀, 通过病理观察, 比较各组腺胃炎的发病情况。

1.4 腺胃指数测定

剖杀鸡只采集腺胃称重, 计算腺胃指数, 用 SPSS 软件统计分析组间差异性。

1.5 免疫器官细胞凋亡检测

1.5.1 光镜观察 对相应病料进行常规石蜡切片, H. E. 染色, 光镜观察组织中细胞凋亡情况。

1.5.2 原位末端标记检测 载玻片以硝酸洗涤液浸泡, 自来水充分洗涤, 蒸馏水洗, 95% 酒精浸泡 12h 以上, 烘干。再以 0.1% 的多聚赖氨酸水溶液处理, 烘干备用。分别取 42d、60d 各组鸡的胸腺、法氏囊、脾脏等器官, 置 10% 中性福尔马林固定 12h 后, 按常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 制备 4 μ m~5 μ m 厚的石蜡切片, 烘干使切片粘附于处理过的载玻片上。染色程序参照细胞凋亡试剂盒说明操作。

结果判定: 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的细胞。

1.7 动态病理学观察

1.7.1 剖检病变观察 分别于第 14d、21d、42d、60d, 各组随机取 5 只鸡剖检, 观察各组织器官大体病变。同时注意观察自然死亡鸡的病变。

1.7.2 病理组织学观察 取剖检鸡只的腺胃、肠管、胸腺、脾脏、法氏囊、肝脏、肾脏、肺脏、心肌、脑等组织器官, 置 10% 中性福尔马林溶液中固定, 进行常规石蜡切片, H. E. 染色, 光镜观察病理组织学变化。

2 结果

2.1 各致病模型的发病情况及病理变化

对照组鸡生长情况良好, 羽毛光亮, 食欲正常。Q 组、QF 组鸡采食量略有下降, 后期有少数鸡拉灰白色稀粪, 精神略沉郁, 剖检时见有少数鸡的腺胃肿胀。QI 组、QR 组、QRF 组、QRI 组、QRIF 组鸡的精神逐渐萎靡, 食欲下降, 拉黄白色稀薄粪便的鸡逐渐增多, 鸡头部乍毛, 剖检可见部分鸡腺胃轻微肿胀, 十二指肠弥漫性出血, 法氏囊内有少量粘液, 个别鸡胸肌有麦粒状的出血斑。其中 QR 组有半数接种鸡精神沉郁, 头部乍毛, 食欲下降, 乍毛鸡挤在一起, 剖检可见腺胃乳头水肿, 有针尖状出血点, 部分鸡腺胃与肌胃的交界处出血。而 QRIF 组近 75% 的鸡只精神极度沉郁, 头部及全身乍毛, 食欲几乎废绝, 大部分鸡拉水样粪便, 剖检可见近 70% 的鸡腺胃肿大, 病死鸡肠道黏膜严重脱落和出血。

2.2 病毒感染对鸡腺胃指数的影响

第 42d、60d 试验鸡群的腺胃指数结果, 对照组(C 组)的腺胃指数明显低于其余各攻毒组鸡只的腺胃指数。经统计学分析, C 组与其余七组差异显著 $p < 0.05$ 。在攻毒组中, 各组腺胃指数也呈现一定的差异性, QRIF 组腺胃指数最高, Q 组最低。见表 1。

腺胃指数比较(g/kg) ($\bar{X} \pm SD$)

Table 1: Comparative of index number about glandular stomach

	C 组	Q 组	QR 组	QF 组	QI 组	QRF 组	QRI 组	QRIF 组
42d	3.69 \pm 0.33a	4.51 \pm 0.21b	5.14 \pm 0.13b	4.89 \pm 0.56b	5.11 \pm 0.16b	5.42 \pm 0.10b	5.39 \pm 0.35b	5.54 \pm 0.31b
60d	4.38 \pm 0.13a	5.18 \pm 0.41b	5.50 \pm 0.27b	5.19 \pm 0.23b	5.50 \pm 0.16b	5.75 \pm 0.14b	5.81 \pm 0.47b	5.95 \pm 0.79b

注: 同一指标肩注不同小写字母者, 表示组间差异显著($p < 0.05$), 有相同字母者或未标字母者差异不显著($p > 0.05$)。X 为平均数, SD 为标准差。

2.3 病毒感染对免疫器官细胞凋亡的影响

感染病毒后, 各病毒感染组在感染后 7d~14d 可见法氏囊和胸腺部分淋巴细胞的形态学变化呈现细胞凋亡的典型特征, 染色质凝集成团, 集于核膜旁, 胞膜与核膜凹陷, 细胞拉长变形, 形成由细胞膜包围的凋亡小体。脾脏中也有此种凋亡的细胞, 但数量不多。各组凋亡程度差异很大, 有 REV 或 IBDV 混感的组凋亡细胞数量明显增多。

2.4 动态病理组织学观察结果

2.4.1 腺胃、十二指肠及免疫器官病变 各试验组病变性质相同, 但病变程度略有差异, 以 QRIF 组最严重, 具体表现为:

腺胃: 早期腺胃某些腺腔内有多量粘液并混有多量坏死脱落的腺上皮细胞及炎性细胞, 腺上皮细胞见空泡变性, 有时可见腺上皮细胞坏死、崩解。固有层水肿, 有多量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润, 毛细血管充血; 在中后期, 黏膜固有层、腺体内有大量灶状或弥漫性浸润、增生的淋巴细胞、巨噬细胞, 病变可以深入到平滑肌层, 病变严重的黏膜下层和肌层也见有炎症变化, 很多腺管结构破坏, 腺管间有大量炎性细胞广泛浸润。(见图

1、2、3)

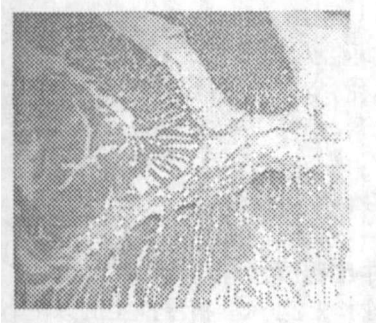


图1 固有层内大量炎性细胞浸润

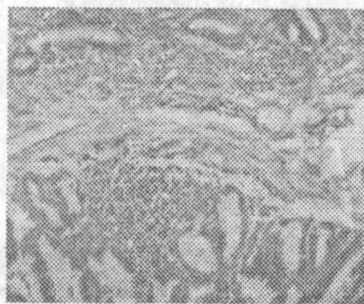


图2 腺体内炎性细胞浸润灶

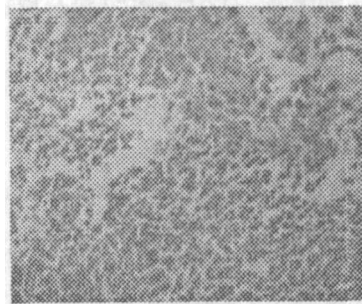


图3 腺腔内充满炎性细胞和脱落上皮

十二指肠:早期仅见炎灶区肠黏膜固有层毛细血管扩张充血,少量淋巴细胞浸润;黏膜杯状细胞及肠腺黏液分泌亢进,肠绒毛残缺不全,部分上皮细胞坏死脱落;肠腔内可见游离的脱落上皮、粘液絮片和少量白细胞。炎灶区肠坏死组织与渗出的纤维素凝结在一起,成为一团粉红色无结构物,其中散布着蓝染的破碎核。后期炎灶肠黏膜固有层淋巴细胞浸润、增生病变逐渐加重。

法氏囊:法氏囊内所有淋巴滤泡均见退行性病变,部分滤泡萎缩,少数滤泡结构消失,仅留有滤泡残影;皮质髓质的分界不清晰,滤泡内几乎没有淋巴细胞,或仅留有淋巴细胞崩解、坏死碎片,网状内皮细胞显著增生;间质增宽,滤泡间有大量嗜中性白细胞浸润,间质内小血管充血,个别区域内有少量红细胞散在。中后期,滤泡皮质区内仅有少量淋巴细胞残存;网状内皮细胞进一步增生,某些滤泡髓质区内有数量不等的由于细胞坏死而形成的空泡状细胞缺失灶,空泡腔内有少量红染的丝网样物质。

胸腺:早期皮、髓质区充血、出血明显,皮质区见多量淋巴细胞核固缩、深染呈现出细胞凋亡、坏死病变,由于细胞坏死形成许多淋巴细胞缺失灶,有的缺失灶为空泡状,其内为少量红染的丝网状物质;后期由于淋巴细胞坏死,一些区域的皮质区面积很狭窄,皮质区呈片状不连续分布,且淋巴细胞稀疏;髓质区可见许多淋巴细胞缺失灶。

脾脏:早期脾脏红、白髓的分界极不清晰,白髓区淋巴细胞稀疏,形象不明显;红髓充血、出血,几乎没有淋巴细胞,绝大多数为网状细胞构成的支架。后期红、白髓的分界依稀可见,白髓区有一定数量淋巴细胞,淋巴小结轮廓不清晰,髓球数量增多,红髓区淋巴细胞稀疏,可见网状细胞大量增生,法氏囊疫苗免疫组见淋巴细胞大量坏死崩解。

盲肠扁桃体:固有膜内淋巴细胞数量极稀疏,成纤维细胞增生;法氏囊疫苗免疫后见固有层内某些区域嗜中性白细胞浸润,淋巴小结内有多少不等的淋巴细胞缺失灶,且小结中有少量核固缩、深染的淋巴细胞。

2.4.2 其它非免疫器官 从试验结果看,病毒接种组的非免疫器官都有不同程度的损伤,表现为程度不同的充血、出血、变性、坏死。其中病变以 QRIF 组最严重,QRIF 组和 QRF 组次之,QR 组和 QI 组较轻,QF 组和 Q 组最轻,空白对照组基本没有病理变化,具体病理变化如下:

肾脏:在攻毒早期肾小管之间、肾小球内有程度不同的充血、出血,间质炎性细胞浸润。肾小管之间与肾小球毛细血管广泛性充血、出血,肾小管上皮细胞核固缩、深染,由于肾小管上皮细胞胞浆崩解,上皮细胞之间的界限模糊,肾小管的轮廓不清晰。有些区域出现较大的炎性细胞浸润灶,灶内有大量淋巴细胞及少量巨噬细胞。个别还出现尿酸盐沉积。后期,随着攻毒日龄的延长,肾小管轮廓逐渐清晰,间质中有散在的淋巴细胞增生灶。上述病变以 QRIF 组、QRIF 组最为严重。

肝脏:各病毒接种组肝脏的中央静脉有不同程度的充血,肝细胞颗粒变性。肝细胞之间淋巴细胞浸润,肝窦中有少量红细胞散在。以 QRIF 组变化最明显。

心肌:各病毒接种组可见到不同程度的充血、出血,肌纤维有程度不同的变性,肌纤维间淋巴细胞和成纤维细胞增生。

肺脏:各试验组都不同程度的充血,QRIF 组 42 天时肺间质出现淋巴细胞、网状细胞增生灶,并有少量红细胞散在。

脑:病变轻微,部分组别脑毛细血管充血、神经元周围水肿、空泡化。

3 讨论

3.1 试验设计与病毒选择

刘思当^[4,5]等在网状内皮增生症病毒(REV)单独或与 J-亚群白血病毒(ALV-J)混合感染试验时,均发现有以固有层淋巴细胞浸润为主要特征的病毒性腺胃炎病变。在生产实践中发现,REV 阳性鸡群、患过鸡痘的鸡群、强毒法氏囊疫苗免疫过的鸡群以及平时饲养管理差的鸡群病毒性腺胃炎的发病率会显著增高。我们推

测传染性病毒性腺胃炎的发病原因是多因素的。这包括自身致病力较弱的病毒性腺胃炎的原发病毒,起协同作用的相关病毒,起诱发促进作用的非特异性病毒及非病毒性应激诱发因素。由于单独利用已分离鉴定的致腺胃炎病毒复制该病不易成功,故本研究从新的角度建立起多因子致腺胃炎的病理模型,希望能够成功复制此病,以证明该病属多因子所致疾病。本研究就是基于上述考虑而选择鸡腺胃炎病毒、网状内皮增生症病毒、强毒法氏囊疫苗和鸡痘病毒,通过单独或混合感染而建立多因子腺胃炎病理模型。

3.2 病理变化与腺胃炎的关系

腺胃固有层和腺体内出现大量淋巴细胞增生灶,这与自然病变相同,而对照组没有这种现象,说明腺胃是病毒性腺胃炎主要的靶器官。法氏囊、胸腺、脾等免疫器官均表现为淋巴细胞凋亡及变性坏死病变,网状内皮细胞及间质增生。试验表明,几种病毒的共感染加剧了上述病变程度,因此上述病变是造成免疫机能下降、病毒性腺胃炎病情加重的主要原因。

法氏囊:本研究中,各病毒接种组的病变性质基本相同。损伤轻的主要表现为淋巴滤泡萎缩,皮、髓质区淋巴细胞减少,体现在 Q 组、QF 组;损伤重的滤泡内淋巴细胞广泛性凋亡、坏死,滤泡内形成空泡状结构,后期淋巴滤泡严重萎缩,体现在 IBDV 免疫过的组别。这就论证了由于 IBDV 可导致法氏囊损伤从而促进了病毒性腺胃炎的免疫功能低下这一推测。

值得注意的是本研究中两重和多重感染组早期肾脏病变严重,而后期主要表现腺胃和肠道的病变,这是否为病毒性腺胃炎特异的发病机制,有待于进一步的研究。另外,尽管 Q 组与 QF 组的病变程度差异不大,FDV 的作用不明显,但四种病毒共感染组的病变程度是最严重的,它略重于三重感染组,这就从侧面反映了 FDV 还是起到了加重病理损伤的作用。

由此可见传染性腺胃炎病毒与相关病毒的共感染使病鸡全身性广泛的炎性损伤和免疫抑制进一步加重,腺胃炎病变更加显著,以致疫病的防治更加困难,这也是病毒性腺胃炎高淘汰率和高死亡率的一个主要原因。

3.3 机体细胞凋亡与腺胃炎的关系

在凋亡的诱因中,一些传染性因子特别是病毒发挥着重要作用,如人类的免疫缺陷病毒(HIV)^[6]、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)^[7-9]、鸡网状内皮组织增生症病毒(REV)、鸡传染性贫血病毒(CAV)^[10,11]、鸡的马立克氏病毒(MDV)^[12]均可诱导淋巴细胞凋亡并引起免疫抑制。由试验结果看,各攻毒组均能引起淋巴细胞凋亡,但凋亡的程度有所不同,以四种病毒共感染组最重,QX 株感染组最轻。由于自然发生的病毒性腺胃炎病例均能引起严重的免疫抑制,这就提示我们在腺胃炎发病的同时很可能还有其他免疫抑制性病毒的共感染。本试验中我们加入了 REV、IBDV、FPV 3 种相关病毒,结果显示病毒的多重感染加重了细胞凋亡的程度。这进一步验证了我们的试验设计,并为病毒性腺胃炎的发病机制提供了一项理论依据。

3.4 本试验证明 QX 株单独感染或与 REV、FPV、IBDV 3 种病毒两重或多重感染能成功复制病毒性腺胃炎病理模型。并且两重或多重感染能使病情加重。经病理组织学和细胞凋亡研究证实 QX 株与 REV、IBDV、FPV 3 种病毒两重或多重感染均能造成免疫器官退化性病变,并且病毒的多重感染加重了细胞凋亡的程度,导致免疫抑制,这是 REV、FPV、IBDV 3 种病毒能加重 QX 致病作用的重要原因。

参 考 文 献:

- [1] 周继勇. 鸡传染性腺胃炎的致病性[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(2): 124-127.
- [2] 荣骏弓, 吴东来, 谷守林等. 腺胃病型鸡传染性支气管炎病毒分离株对 SPF 鸡的致病力试验[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(4): 297-300.
- [3] 曹焕礼, 曹伟华等. 鸡传染性病毒性腺胃炎的诊断与防治[J]. 中国家禽, 1999, 21(8): 18-19.
- [4] 商营利. 鸡混合感染 ALV-J 与 REV 的免疫病理学研究[D]. 硕士研究生论文. 山东农业大学, 2003.
- [5] 刘思当. 鸡网状内皮增生症的诊断及淋巴器官的病理变化[J]. 山东畜牧兽医, 2001.
- [6] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267: 146-1463.
- [7] 陈明勇, 王彩虹, 高齐瑜等. 传染性法氏囊病毒变异 E 株感染鸡细胞凋亡的研究[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会第十一次兽医病理学、第十次动物病理生理学术研讨会论文集[C]. 杭州: 中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会, 2001, 44-47.
- [8] 曹永长, 毕英佐, 罗晓秋等. 传染性法氏囊病毒诱导细胞凋亡的初步观察[J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(3): 5-7.
- [9] 毛炳宇, 马晓丽, 赵晖等. 人工感染 IBDV 鸡法氏囊的电镜研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(5): 455-461.
- [10] Jeurissen S H, Wagenaar F, Pol J M A, et al. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection[J]. Virol., 1992, 10(7): 383-388.
- [11] 金华, 徐彦波, 甘永华. 鸡贫血病毒感染鸡细胞凋亡研究[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(6): 542-544.
- [12] Maimura T, Ohashi K, Kon Y, et al. Apoptosis and CD8-down-regulation in the thymus of chickens infected with Marek's disease virus[J]. Arch Virol., 1996, 141: 2243-2249.