

A、J 亚群禽白血病病毒感染肉用种鸡的诊断

李先桥¹, 史开志², 罗明星², 吴松成³, 汪德生^{2*}

(1. 贵阳市乌当区畜牧技术服务中心, 贵州 贵阳 550018; 2. 贵州大学动物疫病研究所, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550005)

中图分类号: S 858.31

文献标识码: A

文章编号: 1007-1474(2009)04-0004-03

摘要: 通过流行病学调查、剖检病变和组织病理学观察, 结合 PCR 技术检测病原核酸, 确诊肉用种鸡群发生了由 ALV-A 和 ALV-J 感染而导致的淋巴细胞性白血病和骨髓细胞瘤型白血病。在检测的 6 只病鸡中, 6 只病鸡均感染了 ALV-J, 2 只病鸡感染了 ALV-A。

关键词: J 亚群禽白血病病毒; A 亚群禽白血病病毒; 诊断

Diagnosis of Avian Leukosis Virus Subgroup A and Avian Leukosis Virus Subgroup J Infection in Breeding Chicken

Li Xianqiao¹, Shi Kaizhi², Luo Mingxing², Wu Sangcheng³, Wang Desheng^{2*}

(1. Wudang Center of Farming Technical Service, Guiyan 550018, China; 2. Institute of Animal Disease, Guizhou University, Guiyang 550025 China;

3. Guizhou Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guiyang 550005, China)

Abstract: Through epidemiological investigation, autopsy and Histopathological changes study, combining with the PCR technology, the infected broiler breeders were diagnosed as Avian Lymphocytic Leukemia and Avian Myeloid leucosis caused by Avian Leukosis Virus Subgroup J (ALV-J) and Avian Leukosis Virus Subgroup A (ALV-A) co-infected. In the 6 infected chicken, all the chicken were infected by ALV-J, 2 were infected by ALV-A.

Key words: ALV-J; ALV-A; Detection

禽白血病病毒 (Avian Leukosis Virus, ALV) 是一类具有某些重要共同特性的病毒, 分类学上属反转录病毒科的 C 型反转录病毒群 (或肿瘤病毒群)。从鸡分离到的 ALV 可划分为 A、B、C、D、E、J 6 个亚群, 其中 A、B、C、D、J 亚群属于外源性 ALV, 可引起多种肿瘤性疾病, 统称为禽白血病 (Avian Leukosis, AL); E 亚群属于内源性 ALV, 没有致瘤性。AL 广泛存在于世界各地, 生产中以淋巴细胞性禽白血病 (LL) 最为常见, 但由 ALV-J 引起的骨髓细胞瘤型白血病 (ML) 的危害日益突出^[1~3]。AL 造成的损失主要表现在引起鸡群生产力下降和发病死亡, 同时造成感染鸡免疫抑制, 由 ALV 直接造成的鸡群死亡率可达 20% 甚至更高, 感染发病鸡的产蛋率和蛋的品质均会出现不同程度的下降^[4]。

2008 年底, 贵州省某肉用种鸡场鸡群开产前发生疑似 AL, 鸡群产蛋率严重偏低, 死淘率明显上升。部分鸡精神沉郁, 鸡冠苍白, 食欲减退, 鸡体逐渐消瘦, 以手触摸病鸡的腹部可感觉到肿大的肝脏。为确诊鸡群病因, 2009 年 1 月笔者对鸡群展开了流行病学调查, 并在贵州大学动物疫病研究所

进行了剖检和组织病变观察, 以及病原核酸的 PCR 检测。

1 材料与方法

1.1 主要材料 贵州省某肉用种鸡场疑似 AL 病鸡 6 只。MDV、ALV-A、ALV-J 阳性对照毒株, 由贵州大学动物疫病研究所分离保存。PCR 扩增相关试剂, 购于大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 发病鸡群流行病学调查 调查发病鸡群品种、养殖规模、发病日龄、临床症状、发病特征及生产性能等。

1.2.2 病鸡剖检病变观察 对 6 只病鸡进行现场解剖, 观察病鸡内脏器官的病变, 统计不同器官的病变发生率。

1.2.3 病鸡组织病变观察 取病、死鸡的肝和肾, 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片, 伊红-苏木素染色后进行病理组织学检查。

1.2.4 ALV 核酸检测 将 6 只病鸡肝脏分别剪碎, 按 1:5 的比例添加 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.01 mol/L, 充分研磨成组织匀浆液, 10 000 r/min 离心 10 min (4℃), 取上清液 500 μl 按 SDS-Proteinase K 法提取病料总 DNA 样本, 稀释到 1 μg/μl 后 -20℃ 保存备用。

根据 ALV 的基因组特征, 基于 ALV 的 Pol 结构设计上游引物 H5。根据 ALV-J 和 ALV-A 囊膜糖蛋白基因 gp85 的基因序列, 分别合成针对 ALV-J 和 ALV-A 的特异性下

收稿日期: 2009-05-19

项目基金: 贵阳市农业局科学技术计划项目 ([2008] 动防-01)

作者简介: 李先桥 (1974-), 男, 贵州遵义人, 兽医师。

* 通讯作者: E-mail: shkzjp@163.com

引物 H7 和 EnvA。H5 + H7 针对 ALV - J 亚群, H5 + EnvA 针对 ALV - A 亚群。引物序列见表 1。

表 1 不同引物核苷酸序列资料

编号	位置	核苷酸序列(5'-3')	预期扩增长度	检测目的
H5	Pol	GGATGAGGTCTACTAAGAAAG		
H7	gp85	CGAACCAAGCTAACACACG	545 bp	ALV - J 亚群
EnvA	gp85	AGAGAAAGAGGGTCTCTAAGGAGA	691 bp	ALV - A 亚群

以提取的 DNA 样本作为模板, 分别针对 ALV - J 和 ALV - J 的 gp85 基因进行 PCR 扩增, 反应体系: 10 × PCR buffer 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μl, dNTP (10 mmol/L) 1 μl, TaqE (2.5 U) 1 μl, 上下游引物各 1 μl, DNA 模板 2 μl, 灭菌双蒸水 (ddH₂O) 36 μl, 总反应体系为 50 μl。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后 35 个循环, 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 再延伸 10 min。试验同时设立相应的阳性对照和阴性对照。

1.2.5 MDV 鉴别诊断 针对马立克氏病病毒 (MDV) 长独特区内部重复序列 132 bp r 基因, 参考相关资料报道^[5], 合成 1 对特异性引物 P1 + P2, 进行 MDV 核酸检测。引物序列 P1: 5' - ATGCGATGAAAGTCTATGGAG - 3'; P2: 5' - ATC-CCTATGAGAAAGCGCTTGA - 3'。预扩增片段 317 bp。以提取的 DNA 样本为模板, P1、P2 为引物, 通过 PCR 扩增马立克氏病病毒的核酸。反应体系和条件除采用 55 °C 退火以外, 其余条件与禽白血病毒扩增相同。试验以 MDV 疫苗毒株 CVI988 为阳性对照。

2 试验结果

2.1 发病鸡群流行病学调查结果 发病鸡为 2008 年 8 月从广西引进铁脚麻肉种鸡, 饲养至 110 日龄时存栏数为 9 300 羽。此后部分鸡开始出现精神沉郁, 鸡冠苍白, 食欲减退, 体况消瘦等症状。在开产至 230 日龄期间, 鸡群日产蛋率仅在 50% 左右, 与其它正常鸡群相比产蛋量同期下降了 24%, 死亡率达到了 7.68% (715/9 300)。以手触摸发病鸡的腹部, 可感觉到病鸡肿大的肝脏。

2.2 病鸡剖检病变观察结果 对 6 只病鸡进行剖检, 肝脏肿大, 几乎占据整个腹腔 (6/6); 有的肝脏表面观察到弥漫性、大小不等、向外凸起的灰白色肿瘤结节, 肿瘤结节周围可见出血性病变 (2/6); 有的肝脏色泽变淡, 边缘钝 (3/6)。有的肝脏破裂, 表面覆盖血凝块、质脆 (1/6)。脾脏肿大, 表面光滑发亮, 可见凸起或未凸起、大小不一的灰白色肿瘤结节 (5/6)。肾脏肿大, 隆起凸入腹腔, 呈现花斑状 (1/6)。法氏囊肿胀, 似乒乓球大小, 从浆膜面亦可观察到肿胀的瓣膜结构, 剖开囊腔后发现瓣膜上的结节状肿瘤 (2/6)。各个器官肉眼观察病变率是: 肝脏 100%, 脾脏 83.3%, 法氏囊 33.3%, 肾 16.6%。心、肺、坐骨神经未见明显的肉眼可见病变。

2.3 病鸡组织病变观察结果 通过显微镜观察: 在病变的肝组织可观察到大量的肿瘤细胞, 正常肝组织被压缩, 肝细胞发生空泡变性; 肿瘤细胞呈灶状聚集, 并不断向肝组织浸润性生长, 形成鲜明或不太明显的分界。在肾小管之间观察到大量的肿瘤细胞增生灶, 增生灶附近的肾小管上皮细胞发生变性, 甚至出现核碎裂、核消失的现象, 结果导致上皮细胞坏死、脱落。在油镜下, 肿瘤细胞主要表现为两种形态: 一种为核大浓染的淋巴样细胞, 胞浆少, 嗜碱性 (见图 1); 另一种为髓细胞样瘤细胞, 胞浆较丰富, 含大量的嗜酸性颗粒, 胞核常偏于一侧 (见图 2)。

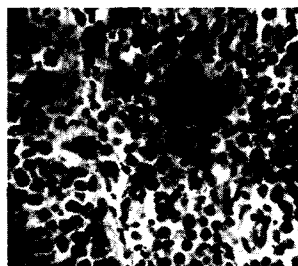


图 1 淋巴瘤细胞

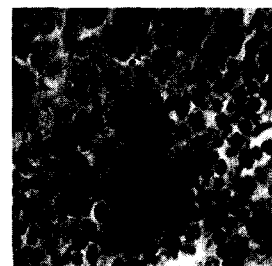


图 2 髓细胞样瘤细胞

2.4 ALV 核酸检测结果

2.4.1 ALV - J 核酸检测结果 从图 3 可见, 6 只病鸡的核酸样本经 PCR 扩增后, 均扩增出了特异性的 DNA 片段, 片段大小与 ALV - J 阳性毒株对照相同, 均为 545 bp 左右, 与预期相符。这一结果说明 6 只病鸡均感染了 ALV - J。

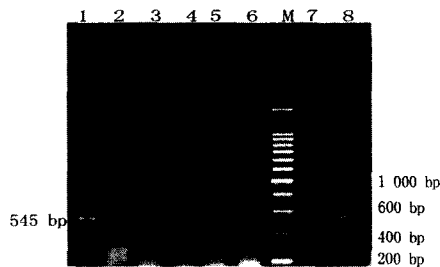


图 3 ALV - J 核酸 PCR 扩增结果

1~6: 待检样本; M: 200 bp Marker; 7: 空白对照; 8: ALV - J 阳性对照。

2.4.2 ALV - A 核酸检测结果 从图 4 可见, 6 只病鸡的核酸样本经 PCR 扩增后, 只有 4 号和 5 号鸡扩增出了特异性的 DNA 片段, 片段大小与 ALV - A 阳性毒株对照相同, 均为 691 bp 左右, 与预期相符。1、2、3、6 号鸡及阴性对照没有扩增出任何条带。这一结果说明 4 号和 5 号鸡感染了 ALV - A。

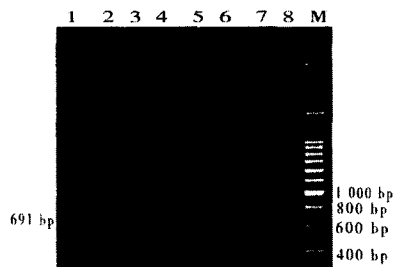


图 4 ALV - A 核酸 PCR 扩增结果

1~6: 待检样本; M: 200 bp Marker; 7: 空白对照; 8: ALV - J 阳性对照。

通过 ALV-J 和 ALV-A 的核酸检测结果,说明鸡群混合感染了 ALV-J 和 ALV-A,其中 ALV-J 感染率为 100% (6/6),ALV-A 感染率为 33.3% (2/6)。

2.5 MDV 核酸检测结果 样本 DNA 经 PCR 扩增后,只有阳性对照扩增出了特异性的目的条带,所有待检样本均为阴性,说明病鸡没有发生 MDV 感染。

3 讨论

试验通过流行病学调查、剖检病变和病理组织学观察,初步判断鸡群发生了 LL 和 ML。对病原核酸的检测,进一步确诊鸡群发生了 ALV-J 和 ALV-A 感染,其中 ALV-J 的感染率高于 ALV-A。由于每一种外源性 ALV 都具有趋于特异致瘤谱,ALV-A 主要转化 B 淋巴细胞,而 ALV-J 主要引起 ML^[1,2],所以在本次感染的病鸡的组织内,不但观察到了恶性增生的淋巴细胞,也观察到了髓细胞样瘤细胞。

ALV 的自然感染率极高,即使在临床健康的鸡群中也普遍存在,因此在进行 ALV 的诊断时,仅仅检测到病毒的血清抗体或者病原核酸都不能说明鸡群发生了 AL,必需结合发病鸡群的流行病学资料,特别是病理组织学材料才能对发病鸡群进行确诊^[4]。由于 AL 常与 MD 同时感染鸡群,而且二者在病理变化上具有相似性,所以在进行 AL 病理诊断时,要注

意与 MD 鉴别。本次诊断中,利用了 ALV 在增殖过程中主要将基因组整合到感染鸡染色体的特征,通过提取病鸡肝组织的 DNA 作为模板来检测 ALV 的前病毒核酸,同时检测 MDV 的核酸,排除了 MD 感染的可能。

对于 AL,目前没有可供使用的疫苗,也没有特效的治疗药物。在生产中一旦确诊发生了 AL,一般只能对鸡群作淘汰处理,以避免药物和饲料的浪费,造成更大的经济损失。

参考文献:

- [1] B. W. 卡尔尼克. 禽病学(第 9 版)[M]. 北京:北京农业出版社,1991. 334~381.
- [2] 崔治中,张志,杜岩. 我国肉用型鸡群中 J 亚群白血病流行现状的调查[J]. 中国预防兽医学报,2002,24(4):292~294.
- [3] 杜岩,崔治中. J 亚群禽白血病病毒中国分离株的人工致病性试验[J]. 中国农业科学,2002,35(4):430~433.
- [4] 辛朝安. 禽病学(第 3 版)[M]. 北京:中国农业出版社,2003. 113~118.
- [5] 张艳萍,刘长军,施维松,等. 一株马立克氏病病毒的分离及其主要致病基因的分析[J]. 中国预防兽医学报,2008,30(2):109~112.

绿亨兽药 安全高效

北京绿亨动保科技发展有限公司是一家以开发推广农业高新技术产品为主的专业性公司。公司的领导层由中国农业大学和农科院一批教授、博士组成,其产品的优良性能已被业界广泛认识,在全国已形成了广泛的营销网络。如果您是经销单位,请加盟绿亨连锁,我们会帮助您提高销售业绩和竞争力,享受知名品牌所带来的人气和利润。

主要产品

蓝环剑: 对圆环、蓝耳病效果很好,并有效防治母猪流产、死胎、木乃伊胎。(散剂)

黄金液: 国家三类新兽药,专治病毒、细菌混合感染。(水针剂)

金福: 对畜禽病毒引起的感冒、发热、咳嗽、喘气、流鼻涕、排黄白色水样稀便有独特疗效。对预防治疗鸡、鸭高致病性禽流感有很好效果。(可溶性粉剂)

绿亨一号: 用于防治家禽各种病毒性疾病,如鸡法氏囊病、禽病毒性感冒、传支、传喉、新城疫、减蛋综合症及家畜圆环病毒、流感病毒、腺病毒、猪瘟病毒等。(可溶性粉)

诚征代理商 诚征县级代理商,欢迎县(市)乡(镇)畜牧兽医站、兽药经营单位来函、来电即赠《动保手册》、《绿亨通讯》和《技术手册》。

附红强克: 专用于猪附红细胞体病的预防、治疗、控制。(预混剂)

快维康: 快维康能提高动物生长速度 15~20%,降低拉稀腹泻率 70% 以上,改善动物肉质品质、提高瘦肉率。(预混剂)

败毒多效: 对圆环病毒病、蓝耳病、热毒血痢、流感、病毒性腹泻及细菌与病毒的混合感染有很好的疗效。(水针剂)

观林亨: 是大观霉素和林可霉素的复方制剂,对畜禽慢性呼吸道病、大肠杆菌病、支原体都有特好的效果。(可溶性粉剂)

系列产品: 康呼散、畜禽康、感康、激妊散、天康保、安胎保、奶多多、氨苄仙、呼速康、冰星、痢圣、博乐、泰别特、氟苯尼考、舒乐康、痢干、倍克球、红弓净、肠炎康、痰咳清、痢泻停、乳炎康、催情散、牛羊速壮、驱虫药、灭鼠药等

北京绿亨动保科技发展有限公司

董事长:刘铁斌 博士 地址:北京海淀区上庄路 119 号绿亨动保公司 邮编:100094

电话:010-82784092 82784098(兼传真) 网址:www.lhdbgs.com 电子信箱:luheng8899@163.com