

肉种鸡禽白血病与马立克氏病混合感染的初步诊断

史荣华¹ 周扬¹ 李一民¹ 张建军¹ 任丹² 高巍²

(¹ 国药集团扬州威克生物工程有限公司,江苏扬州 225127; ² 扬州大学兽医学院)

摘要 2018年11月,江苏省某肉种鸡场26周龄鸡群出现采食下降、精神沉郁、消瘦、产蛋下降、死亡等症状,临床剖检主要病变为肝脏、脾脏肿大,表面可见灰白色结节,腺胃、肾脏肿大,胸骨上可见圆形白色肿瘤病灶。为了明确肉种鸡发病的原因及确定病原,无菌采取肝脏、肾脏等病变组织,开展了PCR鉴定和组织病理学观察等实验室诊断。结果表明,病料PCR检测禽白血病病毒和马立克氏病毒为阳性,组织病理学观察发现肝脏、脾脏、腺胃、心肌内弥漫大量MD和ALV-J特有肿瘤细胞。上述结果初步表明,该病例为J亚群禽白血病病毒与马立克氏病毒混合感染。

关键词 肉种鸡;禽白血病;马立克氏病;混合感染;诊断

中图分类号 S858.31 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2019)09-0199-03

禽白血病(AL)是由禽白血病病毒(ALV)感染引起的免疫抑制性疾病以及各种可传播的良性和恶性肿瘤^[1]。ALV属于反转录病毒科C型反转录病毒属,分为A-K 11个不同亚群,其中A、B、C、D、E、J、K 7个亚群可自然感染鸡^[2],J亚群禽白血病病毒的致病力和感染性较强^[3],可引起肉鸡、蛋鸡、种鸡髓细胞样瘤细胞增生的一种肿瘤性疾病,在世界范围内广泛存在,目前临床上多见骨髓细胞瘤或血管瘤与骨髓细胞瘤混合发生的病例^[4]。鸡马立克氏病(MD)是由马立克氏病毒(MDV)引起的淋巴组织增生和淋巴肿瘤的一种疾病^[5]。MDV属于疱疹病毒科一种α疱疹病毒,这种病毒具有高度的传染性,常以外周神经和其他各种组织器官的单核细胞浸润形成肿瘤为特征。根据病毒株抗原性差异分为3个血清型,并且2~18周龄的鸡均可感染发病,是危害养鸡业的重要传染病。禽白血病(AL)和马立克氏病(MD)是家禽常见的2种病毒性肿瘤病,可水平传播、垂直传播,不仅使

感染鸡群的生产性能下降,而且容易引起免疫抑制,增加对其他疾病的易感性,给家禽养殖业造成巨大的经济损失^[6]。2018年11月江苏某肉种鸡场发生疑似肿瘤病的鸡群,经临床剖检及实验室鉴定为J亚群禽白血病病毒与马立克氏病毒混合感染。

1 材料与方法

1.1 病料信息

病料来源于江苏省某肉种鸡场,26周龄黄羽肉种鸡,剖检疑似肿瘤病症状,无菌采集具有典型病变的肝、脾、肾等病料组织用于PCR鉴定以及组织病理学观察。

1.2 试验材料

DNA提取纯化试剂盒、2×Easy TaqSuperMix、普通琼脂糖凝胶、DL2000 DNA Marker,根据参考文献^[7-9]设计了MDV、REV、ALV的鉴定引物,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,见表1。

表1 PCR引物序列

基因片段	引物名称	引物序列	目的片段大小/bp
MDV-meq	F	5'-CGCGAATTCTACAGTGTAAGAGATG-3'	1 058
	R	5'-TAACTCGAGTGTGAGAGTCAATGC-3'	
REV-LTR	P1	5'-GCCTTA GCCGCCATTGTA-3'	409
	P2	5'-CCAGCCTACACCAGCAACA-3'	
ALV-P27	P1	5'-CACAAAGACTGGCTGATACGGT-3'	348
	P2	5'-CACAAAGACTGGCTGATACGGT-3'	

1.3 PCR检测

采集病鸡肿瘤病变组织,按1:5加入含适当浓度抗生素的灭菌PBS缓冲液,充分研磨,反复冻融3次后,离心取上清^[1],用DNA提取试剂盒抽提组织液中的DNA,置-20℃备用。以提取的病毒DNA作为模板进行PCR扩增。反应体系为:DNA模板2 μL,2×Easy TaqSuperMix 12.5 μL,ddH₂O 8.5 μL,上游引物和下游引物各1 μL。反应程序为:95℃预变性5 min,94℃变性45 s,54℃退火45 s,72℃延伸1 min,共30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶进行电泳,电泳处理后置于凝胶成像系统中拍照鉴定。

1.4 病理组织学检测

用福尔马林固定病变组织(如肝脏、脾脏等),按文献^[9]制作石蜡切片,苏木精-伊红染色,进行组织病理学诊断。

作者简介 史荣华(1987-),男,江苏泰州人,硕士,从事病毒免疫学研究工作。

收稿日期 2019-01-08

2 结果与分析

2.1 病鸡剖检症状

现场剖检发现,病死鸡主要表现为肝脏肿大,表面弥漫性灰白色肿瘤结节,见图1(a)(b);脾脏肿大,有弥漫性灰白色肿瘤结节,见图1(c)(d);胸骨内外侧有圆形白色肿瘤病灶,见图1(e)(f);肠道表面白色肿瘤结节,见图1(g);肾脏肿大,表面弥漫性白色肿瘤结节,见图1(h)。

2.2 PCR鉴定

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,结REV-LTR引物未扩增出目的条带,MDV-meq扩增出目的条带,大小约为1 058 bp,ALV-P27扩增出目的条带,大小约348 bp(图2)。该病料PCR检测REV为阴性,MDV和ALV为阳性。

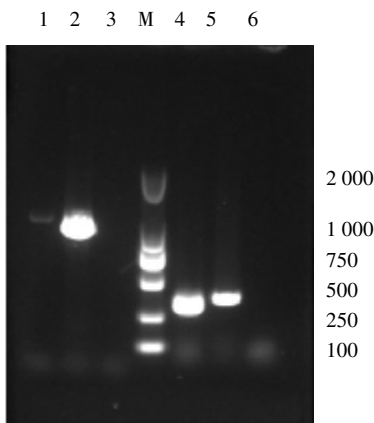
2.3 组织病理学检测

组织病理学显示:肝内多个肿瘤病灶,肝内肿瘤细胞为MD特有的肿瘤细胞,见图3(a)(b);心肌内大量肿瘤细胞



注:a 肝脏肿大;b 肝脏表面弥漫性灰白色肿瘤结节;c 脾脏肿大;d 有弥漫性灰白色肿瘤结节;e 胸骨外侧有圆形白色肿瘤病灶;f 胸骨内侧有圆形白色肿瘤病灶;g 肠道表面白色肿瘤结节;h 肾脏肿大,表面弥漫性白色肿瘤结节。

图1 病死鸡组织病变



注:M—DL2000 DNA Marker;1—样品 MDV-meq 扩增产物;2—MDV 阳性对照;3—MDV 阴性对照;4—样品 ALV-P27 扩增产物;5—ALV 阳性对照;6—ALV 阴性对照。

图2 PCR 鉴定结果

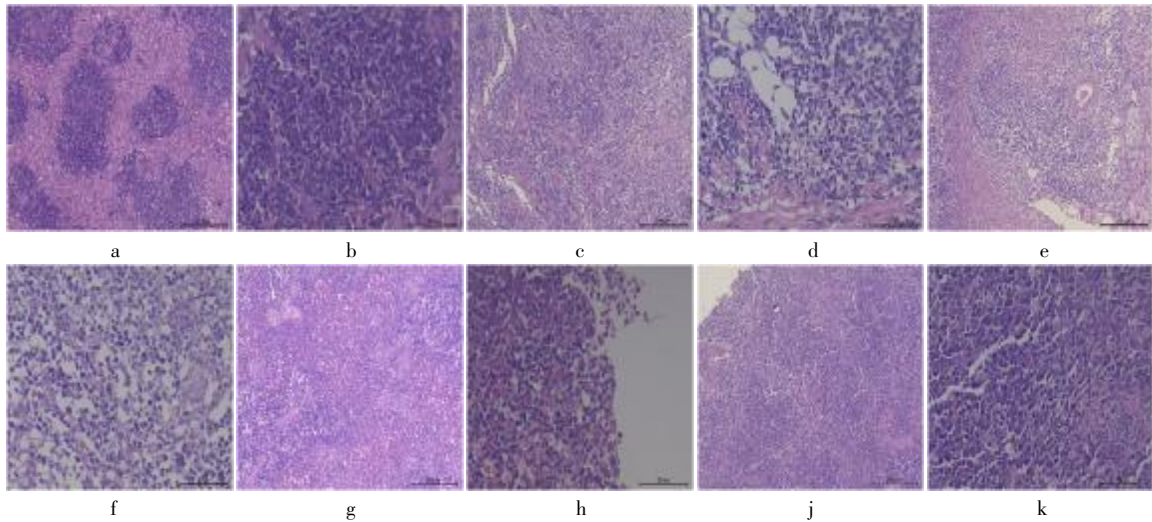
浸润,心肌内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞,见图 3(c)(d);腺胃内大量肿瘤细胞浸润 腺胃内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞,见图 3(e)(f);脾脏 1 内大量肿瘤细胞浸润,脾脏 1 内肿瘤细胞为 ALV-J 特有肿瘤细胞,见图 3(g)(h);脾脏 2 内大量肿瘤细胞浸润,脾脏 2 内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞,见图 3(j)(k)。

3 讨论

禽白血病和马尔克斯氏病是 2 种病原(分别属于 RNA 病

毒和 DNA 病毒)完全不同的疾病,并且都以类似的肉眼可见肿瘤病变为特征^[10]。随着规模化养殖的扩大,家禽疫病已经变得日益复杂,混合感染已经成为肿瘤病毒、免疫抑制性病毒感染的主要方式,给养殖业造成巨大损失^[11]。造成 ALV 和 MDV 混合感染的主要原因可能有以下几种:①ALV 既可以垂直传播,又可以水平传播,祖代鸡场白血病净化不彻底,通过种鸡垂直传染给下一代,从而引起雏鸡产生免疫抑制,免疫应答下降,即使雏鸡接种 MDV 疫苗,仍会感染 MDV 野毒而发病;②除自然传播方式外,接种了被外源性 ALV 污染的弱毒活疫苗,也会引起 ALV 的感染;③雏鸡在免疫 MDV 疫苗时,免疫过程出现了问题,则会导致免疫效果降低或者免疫失败,使鸡群感染 MDV 野毒引起机体免疫抑制,最终通过水平传播感染 ALV^[9];④养殖环境生物安全方面的缺失、饲养环境恶劣、粗放的饲养管理等也会促进病原的扩散与传播^[11]。

本试验从江苏省某肉种鸡场采集病料,根据临床解剖病变,PCR 扩增及病理组织学分析,最终初步诊断该病例为 J 亚群禽白血病病毒与马尔克斯氏病病毒混合感染。J 亚群禽白血病的原发部位在骨髓,骨髓下可见白色石灰样增生的肿瘤组织,隆起于骨表面^[12]。对于此种混合感染的情况,目前主要实行净化种群为主的综合性防控措施^[10]。注射疫苗是预防 MD 的有效方法,从 CVI988/Rispens, 814 株单苗到 cVI988/Ripense+HVI 二联疫苗,每类疫苗能在一段时期内有效控制



注:a 肝内多个肿瘤病灶;b 肝内肿瘤细胞为 MD 特有的肿瘤细胞;c 心肌内大量肿瘤细胞浸润;d 心肌内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞;e 腺胃内大量肿瘤细胞浸润;f 腺胃内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞;g 脾脏 1 内大量肿瘤细胞浸润;h 脾脏 1 内肿瘤细胞为 ALV-J 特有肿瘤细胞;j 脾脏 2 内大量肿瘤细胞浸润;k 脾脏 2 内肿瘤细胞为 MD 特有肿瘤细胞。

图 3 组织病理变化

其发生^[11];对于 AL,目前还没有有效的疫苗,更没有有效的药物可以治疗。因此,比较好的办法就是加强净化淘汰,自行清除 ALV—J 阳性的鸡群或者引进国外鸡群时加强 ALV—J 筛查,最后逐步建立无 ALV—J 感染的鸡群,改善饲养环境^[12]。同时,还应加强种鸡的饲养管理和严格的生物安全措施,以减少水平传播,并选择无外源病毒污染的疫苗进行合理免疫,避免因疫苗污染而导致鸡群感染禽白血病^[13]。本试验诊断为该鸡场下一步的预防和净化工作起到一定的参考作用。

4 参考文献

[1] 李思菲,苏红芹,王一新,等.拉米夫定对禽白血病病毒的体内外抑制效应及其应用[J].中国预防兽医学报,2016,38(9):700-704.
 [2] 林璐璐,王培坤,杨永立,等.40 周龄三黄种鸡暴发禽白血病的诊断与病原分析[J].黑龙江畜牧兽医,2017(8):105-109.
 [3] SIRONI G,MANAROLLA G,PISONI G,et al.Myotropic avian leukosis virus subgroup J infection in a chicken[J].Journal of Veterinary Medicine, 2010,53(7):347-349.
 [4] 顾玉芳,杨玉莹,钟蓓,等.蛋 J 亚群禽白血病与马立克氏病混合感染的病理学诊断[J].湖北农业科学,2011,50(24):5193-5195.

[5] 李海娟,石梦雅,谷战明,等.ALV 与 MDV 混合感染造成鸡群临床肿瘤暴发的诊断[J].中国家禽,2018,40(14):58-61.
 [6] 张洪海,刘青,邱波,等.地方柴鸡中 J 亚群禽白血病与马立克氏病的混合感染[J].畜牧兽医学报,2009,40(8):1215-1221.
 [7] QI Gao,YUN Bingling,WANG Qi,et al.Development and application of a multiplex PCR method for rapid differential detection of subgroup A, B, and J avian leukosis viruses[J].Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52:37-44.
 [8] ZHUANG Xinyu,ZOU Haitao,SHI Huoying,et al.Outbreak of Marek's disease in a vaccinated broiler breeding flock during its peak egg-laying period in China s[J].Veterinary Research, 2015, 11:157.
 [9] 马树兴.禽传染病实验室诊断技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
 [10] 张登祥,犹雯,饶毅,等.血管瘤型禽白血病与马立克氏病混合感染的诊断[J].中国畜牧兽医,2010,37(8):219-220.
 [11] 杨永立,钟兴福,王培坤,等.2014 年广西地方鸡群病毒性肿瘤病例的检测分析[J].中国家禽,2015,37(17):53-56.
 [12] 窦新红,沈海玉,窦套存.一例骨髓瘤型禽白血病的诊断[J].中国家禽,2013,35(4):53.
 [13] 张志,赵宏坤,崔治中.J 亚群禽白血病的诊断和防制[J].中国兽医杂志,2004,40(3):36-37.
 [14] 常超越,闫艳娟,李蕴玉,等.蛋种鸡禽白血病与大肠杆菌病混合感染的诊治[J].兽医临床,2018(14):130-132.

(上接第 198 页)

表 2 经济效益分析

试验池	生产费用/元·hm ⁻²						售价/元·kg ⁻¹		产值 元·hm ⁻²	利润 元·hm ⁻²
	池租	苗种	饲料	水电	药费	人工	鲫鱼	鲢鳙		
1 号	5 250	7 800	14 2575	6 600	1 800	3 750	12	6	235 827.0	68 052.0
2 号	5 250	7 800	13 0335	6 600	1 800	3 750	12	6	221 238.0	65 703.0
平均	5 250	7 800	13 6455	6 600	1 800	3 750	12	6	228 532.5	66 877.5

在北方地区其生长期只有 120 d 左右,当年苗种出池平均规格达 189.4 g/尾,是近年来引近的鲫鱼新品种中生长速度最快的。在试验过程中一直使用鲤鱼苗种饲料,如果用鲫鱼专用饲料,出池规格和产量会更好,当年有望达 200 g/尾以上的上市规格。因此,长丰鲫在北方地区完全有可能当年养殖商品鱼。

试验还发现,长丰鲫抗病能力也很强,在养殖过程中除正常的清塘、消毒外,没有使用任何防病药物,长丰鲫未发生鱼病,养殖成活率达到 76.7%,较异育银鲫中科 3 号成活率提高 20%以上。鉴于长丰鲫生长快、抗病力强、成活率高、

效益显著等优点,适宜在北方地区大力推广养殖。

4 参考文献

[1] 李忠.银鲫新品系:第七代长丰鲫[J].农村百事通,2015(17):40.
 [2] 李忠,邹桂伟,桂建芳,等.长丰鲫[J].中国水产,2017(3):74-79.
 [3] 李秀颖,祖岫杰,刘艳辉.异育银鲫“中科 3 号”人工繁殖及池塘养殖试验[J].现代农业科技,2013(23):262-263.
 [4] 杨洁,杨锦英,赵斌.异育银鲫“长丰鲫”成鱼混养试验[J].科学养鱼, 2018(6):81-82.
 [5] 杨希,白海锋,张星朗,等.培育密度对四倍体异育银鲫新品系“长丰鲫”苗种生长及成活的影响[J].河北渔业,2017(11):29-32.
 [6] 陆建平,周卫华,杨洁,等.异育银鲫“长丰鲫”鱼种培育试验[J].科学养鱼,2017(4):9-10.