

表现腺胃炎的蛋用型鸡 J 亚群-白血病毒 的分离与鉴定

孙淑红, 柴家前, 王 波, 孙洪磊, 王晓云, 崔治中*

(山东农业大学 动物科技学院/动物医学院, 泰安 271018)

摘 要: 从表现腺胃炎的尼克珊瑚粉商品代蛋鸡中分离到 J 亚群-白血病毒(ALV-J)。将病料或鸡白细胞接种于 CEF, 培养 12 d, 分别采用单克隆抗体间接免疫荧光试验检测, 结果 10 只鸡中有 9 只鸡分离到 ALV-J, 其中有 4 只鸡还存在与禽网状内皮增生病毒(REV)的共感染。通过 PCR 扩增 *gp85* 基因, 与已发表的 20 株 ALV-J 进行同源性比较。结果表明, 与来自白羽肉鸡的 HPRS103 的同源性为 97.8%, 而与来自蛋用型鸡的 SD07LK1 株的同源性为 93.0%。本研究发现, 在某些仅仅发生腺胃炎的鸡也可能普遍存在 ALV-J 感染, 再次显示了腺胃炎病料中病毒感染的多样性。ALV-J 可能成为致腺胃炎的病原之一, 但其致病作用有待进一步研究。

关键词: 腺胃炎; 蛋用型鸡; J 亚群-禽白血病毒

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)02-0251-04

Subgroup J Avian Leukosis Viruses Isolated from Egg-type Chickens with Proventriculitis

SUN Shu-hong, CHAI Jia-qian, WANG Bo, SUN Hong-lei, WANG Xiao-yun, CUI Zhi-zhong*

(College of Animal Science and College of Veterinary Medicine,

Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) was isolated from both proventriculus suspensions and blood samples of 9 in 10 laying hens only with proventriculitis, and co-infection of ALV-J with reticuloendotheliosis virus was also confirmed in 4 chickens. The *gp85* genes of ALV-J isolates were amplified by PCR, sequenced and compared to 20 reference ALV-J strains. Sequence comparisons indicated that the proventriculus isolate had 97.8% identity with the HPRS103 strain isolated from white meat-type chickens and 93.0% identity with SD07LK1 strain from egg-type chickens. The result demonstrated that ALV-J infection was common in some chickens with only proventriculus, further indicating the diversity of virus infections associated with proventriculitis. ALV-J may be take part in pathogenesis of proventriculitis in some chickens, but its pathogenic role needs to be further studied.

Key words: proventriculitis; egg-type chickens; subgroup J avian leukosis viruses

腺胃炎多发于雏鸡, 以腺胃显著肿胀、腺胃乳头出血、溃疡为主要特征。不同品种、不同日龄的鸡均有发病。目前, 全国各地均有此病发生的报道, 给养鸡业造成了重大的经济损失。

王玉东等^[1]认为该病病原体为冠状病毒属的传

染性支气管炎病毒 IBV 的变异株。杜元钊等^[2]从肿大的腺胃中分离到一株网状内皮增生病毒(REV)。姜北宇等^[3]也证明了 REV 能够导致鸡腺胃肿大。吴延功等^[4]从腺胃组织的超薄切片中观察到 4 种病毒颗粒, REV、冠状病毒和新城疫病毒等 3

收稿日期: 2009-07-31

基金项目: 山东省中青年科学家基金(2008BS07004); 山东省农业重大应用技术创新课题(2007); 山东农业大学青年科技创新基金

作者简介: 孙淑红(1968-), 女, 山东高密人, 副教授, 博士, 主要从事家禽肿瘤病研究, E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn; 柴家前(1964-), 男, 山东高密人, 副教授, 博士, 主要从事家禽免疫学的研究, E-mail: jqchai@sdau.edu.cn, 二人共为同等贡献作者

* 通讯作者: 崔治中(1944-), E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

种病毒已经证明。有学者认为此病的病原为一种未分类的病毒,另外还有一些病因与此病有关^[5-10]。

对于引起腺胃炎的病因,大多数学者都倾向于由多种因子引起,而并非单一病毒或因子所致^[5-11]。本研究对表现为腺胃炎的 140 d 尼克商品代蛋鸡进行了 J 亚群-白血病毒(ALV-J)与 REV 的分离与鉴定。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2004 年 8 月,山东平阴某蛋鸡场,饲养尼克珊瑚粉蛋鸡 5 000 余只,于开产(130 d)前发病,每天死亡率约 1%。发病鸡鸡冠苍白,羽毛粗乱、蓬松,部分脱落;病鸡极度消瘦,剖检多见腺胃乳头出血、肿胀并有白色渗出物,其他部位未见明显病变。取 10 只病鸡进行检测。

1.2 试剂

ALV-J 单克隆抗体 JE9、REV 单克隆抗体 11B118,美国农业部肿瘤研究所提供;FITC 标记的羊抗鼠 IgG,上海史瑞可生物科技有限公司提供。其他分子生物学试剂购自 Sigma 公司。

1.3 样品的采集与处理

1.3.1 血清 分别取病鸡的抗凝血,立即置 eppendorf 离心管,4 ℃ 12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取白细胞接种于长成单层的 CEF,置于含 5% CO₂ 的 37 ℃ 恒温培养箱中培养。

1.3.2 病料 分别采集病鸡的腺胃,加入 2 倍灭菌生理盐水研磨,直至成匀浆液。将悬液移至离心管中充分摇震后,4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 5 min。取上清用 0.22 μm 滤器过滤,接种 CEF 进行培养。

1.3.3 免疫器官与腺胃指数 分别称取 6 只剖检鸡的体质量,取胸腺、法氏囊、脾脏与腺胃并称其质量,计算与体质量的百分比。同时,设 6 只同日龄的尼克珊瑚粉蛋鸡作为对照,并进行同样处理。

表 1 不同器官与体质量的百分比

Table 1 Percent of different organs/body weight

组别 Group	免疫器官指数 Immune organ index			腺胃指数 Proventriculitis
	胸腺 Thymus	法氏囊 Bursa	脾脏 Spleen	
病鸡 Sick chicken	0.201±0.142(6) ^A	0.026±0.005(6) ^A	0.257±0.105(6) ^A	0.663±0.116(6) ^A
对照鸡 Control group	0.327±0.192(6) ^A	0.073±0.060(6) ^A	0.180±0.022(6) ^A	0.301±0.119(6) ^B

表中数据表示平均值±标准(样本数量)。不同字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)

The numbers in the table indicate mean ± SD (sample size). The different letters indicate that the differences were very signifi-

1.4 大体病变的系统观察

将送检病死鸡进行外部检查,剖检,仔细观察大体病变。

1.5 病理组织学观察

取腺胃固定于 10% 福尔马林液,石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察。

1.6 病毒的分离培养与鉴定

1.6.1 病毒的分离培养 病料接种 CEF 后,置于 38 ℃ 培养箱中培养 2 h,换含 1% 小牛血清的细胞维持液,培养 5~7 d。然后将培养的细胞传代于加有盖玻片的平皿中,继续培养 5~7 d。

1.6.2 病毒的鉴定 采用间接免疫荧光抗体反应(IFA)。

1.6.3 PCR 扩增细胞 cDNA 的 *gp85*(923 bp) 按常规方法进行。提取其中 1 株整合进细胞中的前病毒 cDNA,根据王辉等^[12]设计的引物与反应体系,PCR 扩增和克隆 *gp85* 基因,测序后与 GenBank 中的已知 ALV-J 毒株的 *gp85* 序列做同源性比较。

2 结果

2.1 临床表现与剖检变化

10 只鸡病变极其相似,病鸡皮下脱水,营养极度不良;剖检见胸腺、法氏囊萎缩,腺胃肿大呈球状,质地变硬,其他器官未见明显病变。结果见图 1。

2.2 腺胃的病理组织变化

腺胃黏膜固有层、腺小管间可见数量较多的淋巴细胞增生灶,间质内大小均一的小淋巴细胞浸润,腺小管管腔狭窄或封闭,腺小管上皮细胞脱落(图 2)。

2.3 免疫器官与腺胃指数比较结果

140 日龄被检鸡与同日龄对照鸡的不同脏器指数见表 1。结果表明,与对照鸡相比,被检鸡的胸腺、法氏囊萎缩,脾脏肿大,但差异不显著($P > 0.05$),而腺胃指数差异极显著($P < 0.01$)。

cant($P < 0.01$); the same letter indicates that the differences were not significant ($P > 0.05$)

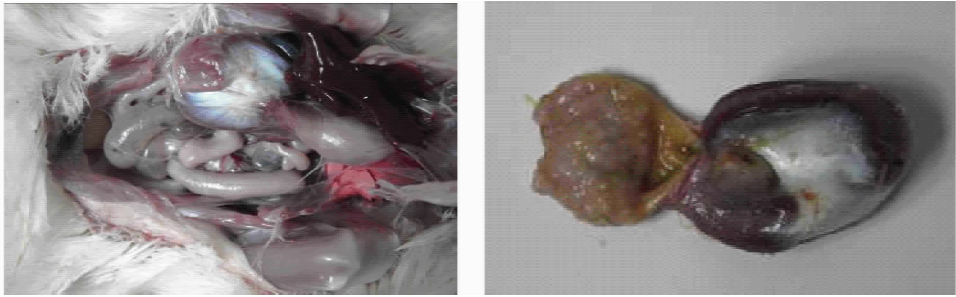


图 1 病鸡的临床病理变化

Fig. 1 Clinic pathology change of sick chicken

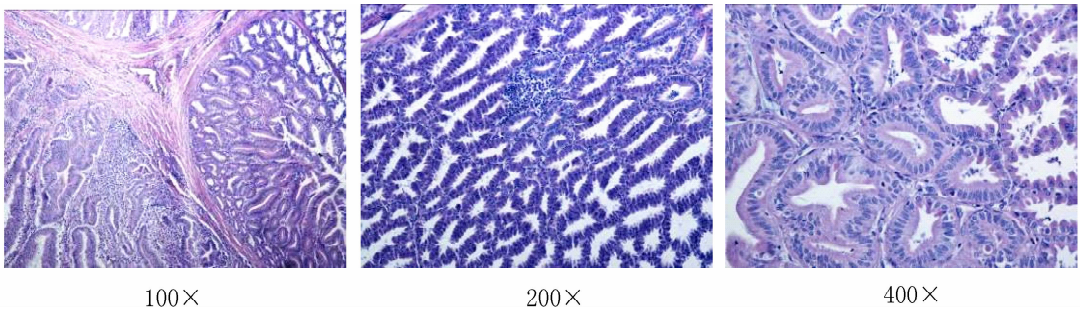


图 2 腺胃的病理变化 HE

Fig. 2 Pathological changes of proventriculitis HE staining

2.4 病毒分离结果

将病料或鸡白细胞接种于 CEF, 培养 12 d, 分别对固定的飞片采用 JE9 (针对 ALV-J)、11B118 (针对 REV) 2 种单克隆抗体进行 IFA 试验。结果, 从 10 只鸡中获得了 5 个单一 ALV-J 株, 同时, 有 4 只鸡存在 ALV-J 与 REV 的共感染。

2.5 PCR 扩增细胞 cDNA 的 *gp85*

PCR 获得预期的 *gp85*, 为 923 bp (图略)。同源性分析结果表明, 该株与来自白羽肉鸡的经典 ALV-J 株 HPRS103 的同源性为 97.8%, 与 NX0101 株的同源性为 93.4%, 而与来自蛋用型鸡的 SD07LK1 株^[12]的同源性仅为 93.0%。系统进化树结果比较发现, 来自腺胃炎鸡的 ALV-J 与来自白羽肉鸡的更为接近 (图略)。

3 讨论

本研究从表现为腺胃炎的 140 d 尼克商品代蛋鸡中分离到 J 亚群-白血病毒 (ALV-J)。10 只鸡中有 9 只鸡分离到 ALV-J, 其中有 4 只鸡还存在与禽网状内皮增生病毒 (REV) 的共感染。从而证

实腺胃炎的诱因并非某一种病毒所引起 (在另外的研究中, 作者已经从表现腺胃炎的罗曼父母代种鸡分离到 REV、ALV-J 以及 NDV, 相关论文在写作中)。

ALV-J 可在鸡诱发不同组织的良性和恶性肿瘤, 是鸡群中除 REV 与马立克氏病病毒 (MDV) 外的又一类重要的致肿瘤病毒。1991 年 Payne 在肉种鸡中首次发现此病^[13], 徐滨蕊等^[14]首次报道 ALV-J 感染蛋用型鸡, 成子强等^[15]报道了山东某鸡场 150 日龄海兰褐鸡感染 ALV-J。而且, ALV-J 常以与其他病毒共感染的形式存在, 如 REV、MDV 等^[16-17], 对养殖业造成的危害极大。ALV-J 的靶细胞为骨髓细胞, 引起骨髓细胞瘤病^[18]。作者在尼克珊瑚粉蛋用型鸡的腺胃组织切片中, 只观察到淋巴细胞增生。而且, 在以往的研究中, 分离与鉴定出的 ALV-J 多来自于发生肿瘤的病鸡, 但作者在仅表现腺胃炎的病鸡中却分离到 ALV-J。显然, ALV-J 在该 140 日龄的鸡群呈持续感染状态, 而且可能已经成为致腺胃炎的病原之一, 从而提示出 ALV-J 表现的多样性。

腺胃炎常常造成 1 月龄内的幼雏鸡发病, 而作

者发现,140 d 尼克珊瑚粉蛋用型鸡出现以腺胃肿胀为主要特征的临床症状,这表明,腺胃炎的表现也已多样化。

对于引起腺胃炎的病因,大多数学者认为可能是多种因子引起,而非单一病毒或因子所致,其中包括传染性支气管炎病毒(IBV)、REV、禽呼肠孤病毒(REOV)以及新城疫病毒(NDV)等,但从未提到ALV-J。在有髓样细胞瘤病变的鸡中偶尔也能看到腺胃肿大的症状,特别是在白羽肉鸡中经常看到腺胃肿大,但一般认为是腺胃肿瘤。而且ALV-J多从发生肿瘤的病鸡中分离到,在仅出现腺胃炎症状的鸡分离到ALV-J,到目前为止未见报道。作者发现,在某些仅仅发生腺胃炎的鸡也可能普遍存在ALV-J感染,再次显示了腺胃炎病料中病毒感染的多样性。作者已从2个尼克蛋用型鸡群暴发的腺胃炎中分离到ALV-J,虽不能证明ALV-J是致腺胃炎的病原之一,但腺胃炎鸡中分离到ALV-J也许与遗传背景有关,其致病性有待于进一步研究。

本研究是国内外关于从仅仅表现腺胃炎的蛋用型鸡分离到ALV-J的首次报道。

致谢:山东农业大学生物学博士后流动站。

参考文献:

[1] 王玉东,王永玲,张子春,等. 鸡腺胃型传染性支气管炎病毒(QXIBV)的分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(1): 1-2.

[2] 杜元钊,吴延功,朱万光,等. 从表现腺胃炎的病鸡中分离到1株网状内皮增生症病毒[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(5): 434-436.

[3] 姜北宇,刘月焕,郑世兰,等. 鸡传染性腺胃炎病原的分离鉴定[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(2): 3-5.

[4] 吴延功,杜元钊,朱万光,等. 传染性腺胃炎组织病理学和超微结构的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(3): 249-254.

[5] GUY J S, BARNES H J, SMITH L, et al. Partial characterization of an adenoviruslike virus isolated from broiler chickens with transmissible viral proventriculitis[J]. *Avian Dis*, 2005, 49(3): 344-351.

[6] PANTIN-JACKWOOD M J, BROWN T P. Infectious bursal disease virus and proventriculitis in broil-

er chickens [J]. *Avian Dis*, 2003, 47(3): 681-690.

[7] PANTIN-JACKWOOD M J, BROWN T P, HUFF G R. Proventriculitis in broiler chickens: immuno histochemical characterization of the lymphocytes infiltrating the proventricular glands[J]. *Vet Pathol*, 2004, 41(6): 641-648.

[8] PANTIN-JACKWOOD M J, BROWN T P, KIM Y, et al. Proventriculitis in broiler chickens: effects of immunosuppression[J]. *Avian Dis*, 2004, 48(2): 300-316.

[9] LUKERT P D, SAIF Y M. Infectious bursal disease [M]//Disease of poultry. 11 ed. CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003: 161-179.

[10] PANTIN-JACKWOOD M J, BROWN T P, HUFF G R. Reproduction of proventriculitis in commercial and specific-pathogen-free broiler chickens[J]. *Avian Dis*, 2005, 49(3): 352-360.

[11] SKEELES J K, NEWBERRY L A, BEASLEY J N, et al. Histologic comparison of lesions induced in the proventriculus and other areas of the intestinal tract of chickens experimentally infected with both classic and variant strains of infectious bursal disease virus [J]. *Poult Sci*, 1998, 77(Suppl 1): 133.

[12] 王辉,崔治中. 蛋鸡J亚群白血病毒病的分离鉴定及序列分析[J]. 病毒学报, 2008, 24: 369-375.

[13] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 801-807.

[14] 徐筱蕊,吕艳丽,董卫星,等. 蛋鸡骨髓细胞瘤病的病理学诊断[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 562-564.

[15] 成子强,刘思当,孟祥凯,等. 商品蛋鸡成髓细胞瘤、血管瘤型J亚群白血病毒病理学初报[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7): 935-940.

[16] 张志,崔治中,姜世金,等. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮组织增生症病毒共感染的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(4): 274-278.

[17] 张志,崔治中,姜世金. 从J亚群禽白血病毒肿瘤中检测出禽网状内皮组织增生症病毒[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 10-13.

[18] 徐为燕. 兽医病毒学[M]. 北京:农业出版社, 1992: 220-221.