

海兰商品蛋鸡白血病与马立克氏病混合感染案例分析

李丹阳 杨恒达 王新卫*

河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002

摘要 从临床流行病学、剖检症状、病理变化、马立克氏病、禽白血病、网状内皮组织增生症病毒特异基因的 PCR 检测等进行综合分析, 以期对河南南阳地区某海兰蛋鸡场鸡群的疑似肿瘤疾病进行确诊。结果显示: 鸡群大体正常, 但零星出现死亡, 死亡鸡极度消瘦, 心、肝、脾、肺等脏器肿胀及个别病鸡脏器肿胀且有肿瘤结节。PCR 检测结果显示: MDV 阳性、ALV 阳性、REV 阴性, 确诊鸡群感染马立克氏病病毒和禽白血病病毒。

关键词 马立克氏病; 禽白血病; 诊断; PCR

马立克氏病(marek's disease, MD)是最常见的一种鸡淋巴组织增生性传染病, 以外周神经和包括虹膜、皮肤在内的各种器官和组织的单核性细胞浸润为特征。该病传染性强, 常给家禽生产带来严重损失。禽白血病(avian leukosis, AL)是由禽白血病/肉瘤病毒群中的病毒引起的禽类的多种肿瘤性疾病的统称, 在自然条件下以淋巴白血最为常见, 世界各地均有本病存在, 大多数鸡群均有感染, 但出现临床症状的病鸡数量较少^[1]。ALV 有 2 种传播方式: 水平传播和垂直传播。大多数鸡通过与先天感染鸡的密切接触获得感染, 从而给后来的生产带来不可估量的损失^[2-3]。网状内皮组织增生症病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)属哺乳动物 C 型反转录病毒属, 只有 1 个血清型, 除引发肿瘤外, 常在感染鸡群中引起严重的免疫抑制或免疫耐受^[4]。这 3 种病毒在生产中可以单独感染, 也可以二重或三重混合感染, 引起鸡群严重的免疫抑制, 继之诱发细菌性及其他病毒性感染^[5], 给鸡群造成更大的损失。近几年, 地方蛋鸡和肉鸡均有 MDV 和 ALV 的混合感染报道, 但在海兰蛋鸡中 MDV 和 ALV 的混合感染却少见报道。

2017 年 5 月, 南阳某养殖场鸡群从 80 日龄出

现发病症状, 并出现死亡, 至 113 日龄时鸡群仍不断死亡。养殖场主随即来农大禽病所就诊, 经临床症状、剖检变化、分子生物学诊断等方法将该病例确诊为禽白血病与马立克氏病混合感染。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 病例。河南南阳某鸡场海兰蛋鸡 10 000 羽, 发病鸡群为 113 日龄, 鸡群从 80 日龄发病并出现零星死亡, 零星死亡一直持续到 100 日龄(每天死亡 1~2 只), 100~113 日龄每天死亡 5~8 只。但鸡群大体精神尚可, 典型的变化是不断有弱鸡出现, 这些鸡精神沉郁、采食量低, 极度消瘦或趋于消瘦; 鸡冠苍白、皱缩, 有的病鸡可触摸到肿大的肝。

2) 主要试剂。DNA Marker DL 2000、Taq DNA 聚合酶、RRI、M-MLV 反转录酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司; RNA 提取用 Trizol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司; 琼脂糖购自 BIOWEST A-GAROSE 公司。

3) 主要仪器。生物安全柜、酶标仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司; PCR 仪购自北京东胜创新生物科技有限公司; ECP3000 三恒多用电泳仪购自北

收稿日期: 2020-03-23

* 通讯作者

李丹阳, 女, 1995 年生, 硕士研究生在读。

京六一仪器厂;紫外凝胶成像系统购自美国 Alpha Innotech 公司;Unival 32R 高速冷冻离心机购自德国 Hettich 公司;HH-4 数显恒温水浴锅购自国华电器有限公司。

1.2 方 法

1)临床症状观察。询问养殖户以及现场观察病鸡,并记录发病症状。

2)剖检病变观察。按照病理学常规方法剖检病死鸡,并记录其典型的病理变化。

3)病毒分离鉴定。

①MDV 的分离及引物设计。将来自河南南阳某鸡场的肿瘤病送检病料(脾和肿瘤组织)用研磨器无菌研磨(8 000 r/min,5 min),按病料 1:5 加入 PBS 液,病料反复冻融 3 次备用。然后采用酚-氯仿抽提法提取患病组织 DNA,同时设计 1 对特异性引物如下,MDV UL19 P5 上游:5'-CCCGATATTAT-CATTKCHCC-3'和 MDV UL19 P6 下游:5'-CTCG-CATTATTATCT GAAGT-3',扩增的 DNA 片段预期长度为 521 bp。

②ALV 和 REV 的分离及引物设计。因其出现贫血及肿瘤现象,利用组织血液 RNA 提取试剂盒提取患病组织 RNA,经反转录成 cDNA。设计合成 1

对针对 ALV 特异性引物如下,ALVgp85 U2 上游:5'-GCCACC TCCCCT TTTC AA-3'和 ALVgp85 L2 下游:5'-GAA AAT TSC GGGTGGTAGC-3',扩增的 DNA 片段预期长度为 778 bp。同时,设计 1 对 REV 特异性引物如下,REV-1 上游:5'-CAT ACTGGAGCCAATGGTT-3'和 REV-2 下游:5'-AATGTTGTACCG AAGTAC T-3',扩增的 DNA 片段预期长度为 291 bp。

2 结果与分析

2.1 临床症状

病鸡主要症状为张嘴呼吸,鸡冠发白,脚爪干瘦无光泽(图 1),精神沉郁、消瘦(图 2)。同时,可见部分病鸡虹膜受到侵害导致失明,一侧或两侧虹膜不正常,色彩消退。

2.2 病理变化

剖检病鸡主要见内脏肿瘤:肝脏肿大,见有多个肿瘤结节,结节呈纽扣状或其他形状,大小不一,遍布肝脏(图 3);脾脏肿大,可见肿瘤增生(图 4),肾脏局部肿大,肿瘤结节可见(图 5),个别肺部也出现肿大。

2.3 病毒分离鉴定结果

1)MDV 的 PCR 鉴定。以提取的 DNA 为模板进



图 1 脚爪干瘦无光泽



图 2 病鸡消瘦

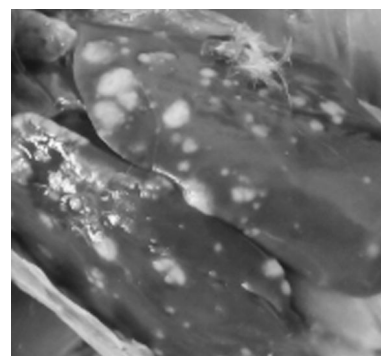


图 3 肝脏肿大有明显结节



图 4 脾脏重度肿大

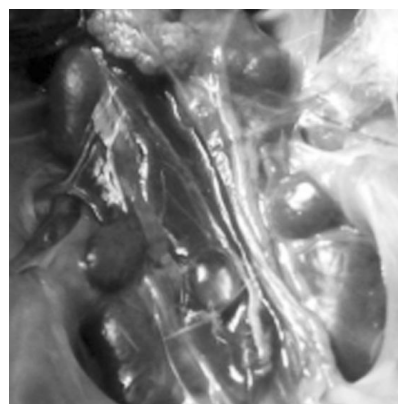
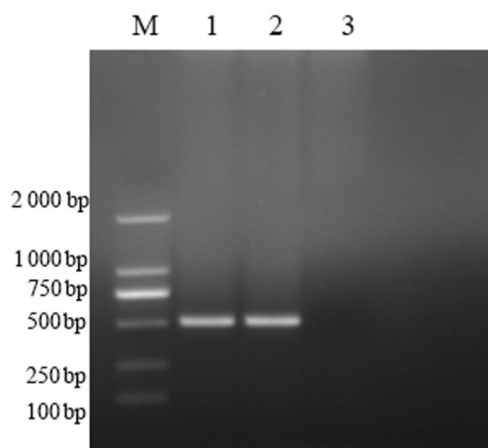


图 5 肾脏肿大

行 PCR 扩增,产物的凝胶电泳结果显示在约 521 bp 出现清晰的目的条带(图 6),与预期的产物片段大小一致,即 MDV 阳性。



注:M:DNA marker(DL 2000);1.病料;2.阳性对照;3.阴性对照;下同。

图 6 MDV PCR 扩增结果

2)ALV 和 REV 的 PCR 鉴定。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物的凝胶电泳结果显示在约 778 bp 处出现清晰的目的条带(图 7),与预期的产物片段大小一致,即 ALV 阳性,但在 291 bp 处未呈现相应条带(图 8),即 REV 阴性。

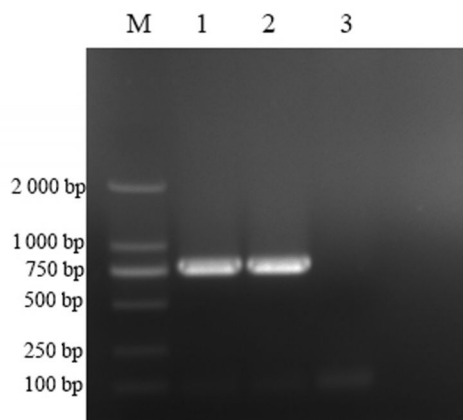


图 7 ALV PCR 扩增结果

根据该鸡场鸡群的发病情况、临床症状、病理剖检变化、PCR 及 RT-PCR 结果显示 MDV 阳性、ALV 阳性、REV 阴性等综合分析,可确诊该发病鸡群为马立克氏病病毒和禽白血病病毒混合感染。综合以上检查结果,确诊该鸡场鸡群混合感染了马立克氏病病毒和白血病病毒。

3 讨论

根据该鸡场鸡群的临床表现:鸡群精神沉郁、

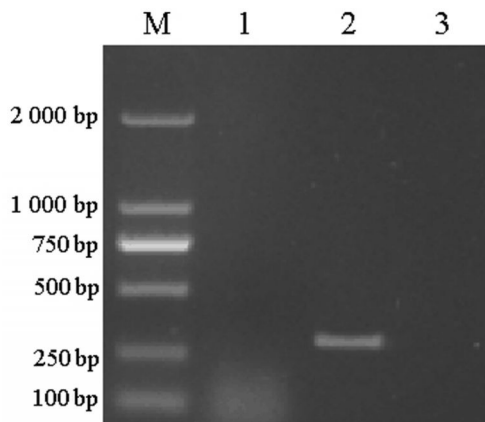


图 8 REV PCR 扩增结果

消瘦、鸡冠发白、脚爪干瘦,发病日龄从 80 日龄至送诊时不断有病鸡出现,而且病理剖检可见肝脏、肾脏等脏器肿瘤结节,结合实验室的 PCR 检测结果证实该商品海兰蛋鸡群感染了马立克氏病病毒和禽白血病病毒。

马立克氏病、禽白血病和网状内皮组织增生症均为禽病中常见的病毒性肿瘤病^[6],它们均可引起免疫抑制,也可共感染或引起继发、混合感染,导致鸡群生产性能下降等^[7]。这些疾病在我国没有净化的鸡群中更为常见^[8]。但近年来,其中的 2 种疾病共感染在海兰净化鸡群中发生还是不多见^[9],而对于该海兰鸡群发生 MD 和 AL 共感染的原因值得思考。在本病例中,MD 发生的可能原因有:环境存在强毒导致疫苗毒不能保护鸡群,或者漏防,或者母源抗体干扰,此外也不能排除种鸡群携带白血病病毒,引起子代鸡先天性感染干扰 MD 疫苗的免疫而引起 MD 发生。而对白血病,我国海兰蛋鸡,尤其引进的祖代鸡都进行了白血病净化。商品代海兰蛋鸡白血病的发生和流行率很低,发病病例也很罕见。而本病例的海兰商品代蛋鸡感染白血病的原因值得探究。养鸡场主反映,发病鸡为引进青年鸡,对鸡苗的来源与免疫情况不了解,卖方仅说要求防疫的疫苗均做了防疫,该批青年鸡的父母代种禽来自质量可靠的大厂家。但该病传播方式为垂直传播和水平传播,鸡群感染并发生白血病的最可能原因是种鸡带毒、孵化室污染或者后来使用了劣质疫苗(存在白血病病毒污染的疫苗等)^[10],但具体是何种风险因子导致,因涉及多个厂家,使用的疫苗也不明晰,无法进行流行病学追踪。

为进行鉴别诊断,笔者进行了 REV 的检测,发