

# 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病

成子强 张 利 刘思当 张玲娟 崔治中

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

**摘 要** 首次报道了中国特有鸡种——麻鸡 J 亚群白血病的发病情况。山东某种鸡场饲养的中国麻鸡,于开产前出现消瘦、贫血、瘫痪等症状,死亡率达 10%。经大体剖检发现,病鸡的内脏器官均弥漫性肿大,色彩斑驳,质地较硬;在胸骨内侧、小肠浆膜面和气管粘膜面出现大小不等的肿瘤结节,呈灰白色。组织学检查发现,增生的肿瘤细胞为均一的髓细胞。用禽白血病病毒 J 亚群(ALV-J)的特异性引物进行 PCR 检测,阳性率为 89%(15/17);PCR 产物测序,其基因序列、预期氨基酸序列与 ALV-J 原型株 HPRS-103 的同源性分别为 98.05% 和 97.4%。用 ALV-J 单克隆抗体,经免疫组织化学检测发现,在肿瘤组织、肝、脾、肾、骨髓、腺胃中呈现强特异性染色。上述检测表明此髓细胞肿瘤是由 ALV-J 感染引起的。ALV-J 麻鸡病例的发现警示:应注意中国地方种鸡的白血病净化工作。

**关键词** 中国麻鸡 J 亚群白血病,病理学,PCR,免疫组织化学

中图分类号 S855.3 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)04-0584-04

禽 J 亚群白血病是由白血病病毒 J 亚群(ALV-J)引起的、主要侵害肉鸡的一种肿瘤性疾病。1991 年 Payne 在肉种鸡中首次发现此病<sup>[1]</sup>。此后,在世界各大洲的肉鸡群中连连爆发,尤其在 1997~1998 年间,对世界养禽业造成了毁灭性的打击。1999 年后,我国一些地区的肉(种)鸡中也频发此病<sup>[2~5]</sup>。目前,ALV-J 已散布于世界各地,成为禽业所面临的主要病原之一。Payne 等科学家对 ALV-J 的宿主范围进行了广泛的调查后发现,ALV-J 可以感染蛋鸡,但不引起肿瘤<sup>[6]</sup>。在此之前,中国本土的地方种鸡还未见感染此病的报道。

中国麻鸡是中国特有的优良鸡种,其包括许多地方品种,如福建麻鸡、崇仁麻鸡和尤溪麻鸡等,这些麻鸡都是肉蛋兼用型,具有性情活泼、敏捷、觅食力强、抗病性强、肉质细嫩、肉鲜味美等特点<sup>[7]</sup>。近年来,我国地方优良种鸡呈现规模化、集约化发展,在极大地提高生产力的同时,也给疾病的防制带来了新的挑战。尤其是外来病毒,地方鸡对这些病毒不具有遗传抵抗力,且重组病毒宿主范围的扩展可能波及地方种鸡,使其感染和发病率有所增高。

2004 年 9 月,山东某种鸡场饲养的 15000 只福建麻鸡种鸡,于开产前出现消瘦、贫血、瘫痪等症状,

死亡率达 10%。经病理学、病毒学和免疫组织化学检测发现此病为 J 亚群白血病,这在麻鸡中还是首次发生,具有重大临床意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

蛋白酶 K,华美公司产品;ALV-J 单克隆抗体,扬州大学秦爱建教授惠赠;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,北京中山公司产品。PCR 产物纯化试剂盒, Promega 公司产品;PCR 仪(PTC-100),MJ 公司产品;石蜡切片机,Leica 公司产品。

### 1.2 病理学检测

**1.2.1 大体病变观察:**将送检病死鸡进行外部检查,剖检,观察大体病变。

**1.2.2 病理组织学观察:**取肿瘤结节、股骨髓、脾、肝、肾、心脏、骨骼肌、肺、气管、卵巢(睾丸)、小肠、腺胃、胰腺、大脑、小脑、坐骨神经等组织于 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋、切片,HE(苏木素与伊红)染色,光镜观察。

### 1.3 病毒学检测

**1.3.1 引物设计与合成:**根据 ALV-J 原型株 HPRS-103 前病毒基因组 DNA gp85 囊膜糖蛋白基因两端

基金项目:山东农业大学博士基金项目(22052)

作者简介:成子强(1971-)男,内蒙古海拉尔市人,副教授,博士,主要从事动物病毒及分子病理学的研究。Tel:86-538-8249526;Fax:86-538-8242544;E-mail:zhiziqiang@sohu.com

收稿日期:2005-01-18,修回日期:2005-04-08

的一段序列作为引物。正向引物( $P_1$ ):5'-CTGGATCCATGGGAGTTCATCTATTGCAACAACCAG-3'; 反向引物( $P_2$ ):5'-TACTGCAGTTAGCGCCTGCTACGGTGGTGACC-3'。正向引物与反向引物分别相当于HPRS-103前病毒基因组DNA序列5476#~5500#和6399#~6369#,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.3.2 PCR用DNA模板的制备:**17只病鸡的肝脏,每个肝脏样品取约100mg,消化缓冲液研磨,蛋白酶K(100 $\mu$ g/mL)于56 $^{\circ}$ C消化过夜,再用酚-氯仿抽提,制备基因组DNA,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

**1.3.3 PCR反应:**反应体系(50 $\mu$ L):1 $\times$ buffer,0.25mmol/L dNTP,引物 $P_1/P_2$ 各0.5mmol/L,1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>,3U/ $\mu$ L Taq酶,1 $\mu$ g基因组DNA。反应条件:95 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 保温5min。

**1.3.4 PCR产物测序:**将PCR产物纯化,寄送上海生工生物工程技术有限公司测序。

## 1.4 免疫组织化学检测

采用组织芯片方法,HE染色进行组织定位,免疫组织化学染色参照文献[8]进行。

## 2 结果

### 2.1 病理学检测

**2.1.1 大体病变:**病鸡极度营养不良,羽毛蓬乱,鸡冠苍白。剖开腹腔后,肝脏、脾脏、肾脏显著肿大,为正常的2~3倍,质地变硬,色彩斑驳;心脏、肺脏、腺胃稍肿大,质地变硬,上有灰白色小结节;肠管浆膜、胰腺表面、气管粘膜和胸骨内侧有米粒至花生大小不等灰白色小结节;法氏囊萎缩;长骨变脆,骨髓呈灰白或黄白色,神经组织未见病变。

**2.1.2 组织学病变:**大多数组织器官(肝脏、脾脏、心脏、肾脏、肺脏、卵巢、腺胃、小肠、胰腺、气管、骨髓、胸骨)都有不同程度的变性坏死和髓细胞增生。增生的细胞由大小一致,比较单纯的髓细胞组成,髓细胞体积较大,核呈圆形、椭圆形、肾形,一般偏于一侧,胞浆丰富,含大量的圆球形嗜酸性颗粒(图版II-A)。肿瘤组织中为大量、密集的髓细胞,可见核分裂相,未见坏死细胞,可推断肿瘤正处于活跃的增生状态。坐骨神经、大脑、小脑只有轻微的变性和水肿,而没有髓细胞增生。

### 2.2 病毒学检测

**2.2.1 PCR检测:**将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果除7号和11号为阴性外,其余15只为阳性,在0.9kb左右处有一亮带,产物均匀一致,引物二聚体条带较少(图1)。

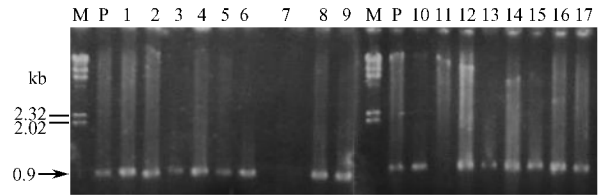


图1 发病鸡肝脏ALV-J特异性PCR结果

Fig.1 The result of PCR for ALV-J detection

M:Marker; P:Positive control; Lane7 and lane11 were negative; The others were positive.

**2.2.2 PCR产物序列测定:**该基因序列全长924个碱基,与ALV-J原型株HPRS-103的gp85基因长度完全一致,其中有18个碱基发生突变,二者的基因序列及预期氨基酸序列与HPRS-103的同源性分别为98.05%和97.4%。预期氨基酸序列如下,共308个氨基酸。

```
GVHLLQQPGN  VWVTWANKTG  RTDFCLSLQS  ATSPFRTCLI
GIPQYPLNTF  KGYVTNVTAC  DNNTDLASQT  ACLIKALNTT
LPWDPQELDI  LGSQMIKNGT  TRTCVTFGSV  CYKENNRSRV
CHNFDGNVNG  TGGAERELRD  FIAKWKSDDL  LIRPVYNQSW
TMVSPINVES  FSISRRYCGF  TSNETRYRGR  DLSNWCSSKR
GEWSAGYSNG  TKCSSNTIGC  GGNCTIEWNY  YAYGFTFGEQ
PEVLWNNGTA  KALPPGIFLI  CGDRAWQGIP  RNALGGPCYL
GQLTMLSPNF  TTWITYGPNI  TGHHRSSR
```

### 2.3 免疫组织化学检测

ALV-J特异性抗原表达阳性见于髓细胞瘤、骨髓、肝脏、脾脏、肾脏、心肌、卵巢、小肠、腺胃,但在脑、坐骨神经中都未见特异性抗原表达。肿瘤组织中部分髓细胞呈强阳性染色,着色部位主要为细胞浆,胞浆背景为均质棕色,内有颗粒状棕黑色着色(图版II-B);骨髓中部分髓细胞胞浆着色,着色部位与肿瘤组织中髓细胞相似,但阳性细胞数量较少;肝脏中主要着色细胞为窦状隙内皮细胞和枯否氏细胞及部分髓细胞,着色部位为胞浆(图版II-C);脾的着色部分主要集中于髓窦内皮细胞和网状细胞及部分髓细胞(图版II-D);肾脏在肾小管上皮细胞的胞浆和胞膜呈阳性着色(图版II-E);卵巢ALV-J抗原的特异性表达见于结缔组织和肿瘤细胞(图版II-F)。

阳性对照和自然病例相似,只是着色较浅;阴性对照,即正常鸡组织及未加一抗的组织未见任何着色。

### 3 讨论

对于经典白血病,由于其发病周期长,死亡率低( $\leq 1\%$ )一直没有引起养殖业足够的重视,但自英国的 Payne<sup>[1]</sup>分离鉴定了禽白血病病毒 J 亚群(ALV-J)以来,这种情况发生了改变,尤其是 90 年代后期, J 亚群白血病在全世界爆发,给肉鸡业造成了巨大的损失<sup>[9]</sup>,这才引起人们对这种肿瘤性疾病的高度关注。

近几年,由于种禽公司加强了白血病的净化工作,ALV-J 的发病率有所降低,但这种选择压的存在,可能会促使病毒进一步重组(突变),从而导致宿主范围的扩展。Rainey 等<sup>[10]</sup>研究显示,ALV-B 囊膜基因内 hr1 区一个氨基酸突变,导致了 ALV-B 宿主范围向非禽细胞扩展,包括人、狗、猫、鼠等,而选择压的存在很可能会使突变发生的周期缩短。最近在蛋鸡中发现的 J 亚群白血病<sup>[11]</sup>,出现了典型的髓细胞瘤。那么,这种引起蛋鸡发生肿瘤的 ALV-J 是由于病毒序列发生了改变,还是中国境内的蛋鸡对其高度易感,还有待于进一步研究。Gingerich 等<sup>[12]</sup>研究发现,实验接种 J 亚群和 B 亚群重组病毒可使 40% 蛋鸡产生肿瘤,这说明病毒基因的突变也会对其致瘤性产生重要影响。中国麻鸡属于肉蛋兼用型,在肉鸡和蛋鸡之间属于过渡类型,可以说是 ALV-J 理想的攻击对象。这次在中国麻鸡中发现 J 亚群白血病,对于 ALV-J 流行病学的完善起到了至关重要的作用。

中国麻鸡中发现的 J 亚群白血病比进口鸡种的发病要严重得多,除了在内脏器官发现髓细胞瘤的增生以外,在胸骨、气管、胰腺,甚至脂肪中也发现了髓细胞的增生。说明麻鸡对 ALV-J 的抵抗力较差,或者说根本不存在年龄和遗传抵抗力。对 PCR 产物测序发现 ALV-J 基因序列发生了一定的突变,这些突变的碱基可能包含了决定其致瘤性的关键序列,这有待于进一步研究。中国麻鸡中 J 亚群白血病的发现警示我们,在保护我国特有鸡种的同时应注意这些鸡的白血病净化工作,防止 ALV-J 进一步向中国地方鸡种蔓延。

近几年,随着我国畜牧业的高速发展,我国地方优良鸡种的保护工作也逐渐受到了重视。但由于地方种鸡饲养模式的改变及病毒重组现象的发生,使疾病流行特点发生了很大的变化。最近,在麻鸡中发现了马立克氏病<sup>[13]</sup>,说明在地方种鸡中的肿瘤性疾病有上升的趋势,有关部门应积极采取更加严格、完善的保护和防疫措施,避免中国地方种鸡受到这些肿瘤性病毒的攻击。

### 参 考 文 献

- [1] Payne L N, Brown S R, Bunstead N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of General Virology*, 1991, **72**: 801-807.
- [2] 杜岩, 崔治中, 秦爱建. 从市场商品肉鸡中检测出亚群白血病病毒. *中国家禽学报*, 1999, **1**: 1-4.
- [3] 赵振华, 顾玉芳, 王凤龙, 等. 禽骨髓细胞瘤病的病理学初报. *动物医学进展*, 1999, **20**(3): 85-86.
- [4] 成子强, 郝永清, 赵振华, 等. 应用 ELISA 方法调查禽骨髓细胞瘤病. *中国家禽*, 2002, **24**(6): 9-10.
- [5] 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调查. *中国兽医学报*, 2002, **24**(4): 292-294.
- [6] Payne L N, Howes K, Gillespie A M. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV(HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *Journal of General Virology*, 1992, **73**, 2995-2997.
- [7] 陈国宏, 王克华, 王金玉, 等. 中国禽类遗传资源. 上海: 上海科学技术出版社, 2004, 30.
- [8] Gharaibeh S, Brown T, Stedman N, et al. Immunohistochemical localization of avian leukosis virus subgroup J in tissues from naturally infected chickens. *Avian Dis*, 2001, **45**(4): 992-998.
- [9] Payne L N. HPRS-103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathology*, 1998, **27**(Supp 1): S36-S45.
- [10] Rainey G J A, Natanson A, Maxfield L F, et al. Mechanism of avian retrovirus host range extension. *Journal of Virology*, 2003, **77**(12): 6709-6719.
- [11] 徐镛蕊, 董卫星, 何召庆, 等. 间接荧光抗体法快速诊断海兰褐蛋鸡 J 亚群禽白血病的研究. *中国兽医杂志*, 2002, **38**(9): 7-9.
- [12] Gingerich E, Porter R E, Lupiani B, et al. Diagnosis of myeloid leukosis induced by a recombinant avian leukosis virus in commercial white leghorn egg laying flocks. *Avian Dis*, 2002, **46**(3): 745-748.
- [13] 许青荣. 麻鸡马立克氏病的诊断和防制. *湖北畜牧兽医*, 2003, **1**: 33-34.

## Emerging of *Avian leukosis virus* subgroup J in a flock of Chinese local breed

CHENG Zi-qiang\* ZHANG Li LIU Si-dang ZHANG Ling-juan CUI Zhi-zhong

( *Animal Science and Technology College of Shandong Agricultural University , Tai 'an 271018 , China* )

**Abstract** : Myeloid leukemia ( ML ) cases were first diagnosed in a chicken flock of Chinese local breed in Shan dong province . The main symptom included wasting , weight loss , anemia . It caused about 10% mortality of about 15000 birds at the age of 120-day . In the necropsy , gray-white nodules and protrusions in various sizes were commonly observed on the surface of the sternum , intestine and trachea . Almost all viscera tissues showed moderate to severe enlargement with diffuse gray-white nodules . Histological examination indicated that the tumor cells proliferated in tissues were myelocytes with eosinophilic granules in cytoplasm . In PCR with a pair of ALV-J-specific primers , 15 of 17 liver samples were positive . PCR product of one positive sample was sequenced and demonstrated 98.05% and 97.4% identity with ALV-J HPRS-103 strain at nuclei acid and amino acids level , respectively . By immunohistochemistry ( IHC ) technique with ALV-J monoclonal antibody , the most intense staining was in the tumor tissue , liver , spleen , kidney , bone marrow , and proventriculus . The results indicate that ALV-J already caused chickens infection and dead in Chinese local breed .

**Key words** : *Avian leukosis virus* subgroup J , Chinese local breed , Pathology , PCR , IHC

Foundation item : Doctor Foundation of Shandong Agricultural University

\* Corresponding author . Tel : 86-538-8249526 ; Fax : 86-538-8242544 ; E-mail : chziqiang@sohu.com

Received date : 01-18-2005