

# 我国自然发病鸡群中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测 \*

姜世金<sup>1\*\*</sup>, 孟珊珊<sup>1</sup>, 崔治中<sup>1</sup>, 田夫林<sup>2</sup>, 王增福<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018; 2. 山东省畜牧兽医检验中心, 山东济南 250022)

## Epidemic Investigation of Co-infection of MDV, CAV and REV in Spontaneous Diseased Chicken Flocks in China

JIANG Shi-jin<sup>1</sup>, Meng Shan-shan<sup>1</sup>, CUI Zhi-zhong<sup>1</sup>, TIAN Fu-lin<sup>2</sup>, WANG Zeng-fu<sup>1</sup>

(1. Animal Science and Technology College, Shandong Agriculture University, Taian Shandong 271018; 2. Shandong Husbandry and Veterinary inspection center, Jinan Shandong 250022)

**Abstract:** The tissues samples of 828 chickens suspected to be infected by immunodepressive viruses from 42 chicken flocks were collected in Shandong, Henan, Hebei, Beijing, Jiangsu, Guangdong, Guangxi, Sichuan, Jilin, Liaoning and Taiwan, and the DNA was extracted for hybridization in Dot-blot with probes for Marek's disease virus (MDV), Reticuloendotheliosis virus (REV) and Chicken anemia virus (CAV). The results indicated that the checkout ratios of the three viruses are 83.94% (MDV), 61.0% (CAV) and 57.25% (REV); the ratios of triple infection, dual infection, single infection and negative are 44.69%, 31.16%, 15.34% and 8.82%; respectively; 29 of 42 chicken flocks occur triple infection (69.05%), 5 ones occur dual infection of MDV and CAV (11.90%), 3 ones occur dual infection of MDV and REV (7.14%), and two ones not occur MDV, CAV and REV; all the 11 provinces exist MDV, CAV and REV. The results indicated that existing in wide range and co-infection of MDV, CAV and REV in chickens are the important causes for descent of poultry production performance, high incidence opportunistically pathogenic diseases and intumescencia proventricularis in China.

**Key words:** Marek's disease virus (MDV); Reticuloendotheliosis virus (REV); Chicken anemia virus (CAV); Co-infection

**摘要:** 从山东、河南、河北、北京、江苏、广东、广西、四川、吉林、辽宁、台湾 11 省 42 个不同鸡群收集临床有发病表现的 828 只病、死鸡的病理组织样品, 用点杂交方法检测各个样品中马立克氏病 (Marek's disease virus, MDV)、网状内皮细胞增生病毒 (Reticuloendotheliosis virus, REV)、鸡传染性贫血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 的感染情况。结果表明: 828 只病鸡中这三种病毒的检出率均相当高, 分别为 83.94% (MDV)、61.0% (CAV) 和 57.25% (REV), 并且存在非常严重的双重感染 (31.16%) 和三重感染 (44.69%), 单重感染和阴性个体仅占 15.34% 和 8.82%; 在 42 个鸡群中的 29 个存在三重感染, 占鸡群总数的 69.05%, 5 个鸡群存在 MDV 和 CAV 的共感染, 3 个鸡群存在 MDV 和 REV 的共感染, 二重感染占鸡群总数的 19.05%, 仅有 2 个鸡群未检测到这三种病毒; 在地域分布上, 11 个省份均检测到了 MDV、CAV 和 REV, 表明了这三种病毒在我国的广泛分布及其在生产鸡群中的混合感染是导致当前我国养禽业生产性能下降、条件致病性疾病发生严重、临床腺胃肿大症状发生的重要原因。

**关键词:** 马立克氏病病毒 (MDV); 网状内皮细胞增生病毒 (REV); 鸡传染性贫血病毒 (CAV); 共感染

**中图分类号:** Q78; S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125 (2005) 02-0164-04

收稿日期: 2004-10-18, 修回日期: 2004-12-06

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (30330450); 山东省科技攻关计划 (991040801)

\*\* 通讯作者: 姜世金 (1971 - ), 男, 山东莱阳籍, 副教授, 博士, 研究方向为动物免疫学与病毒分子生物学。

Corresponding author: Tel. 0538-8245799; Fax. 0538-8241419; E-mail: sjjiang@sdau.edu.cn

近年来我国出现了一种临床上以病死鸡消瘦或高度消瘦为主要临床特征的传染病,解剖这种自然发病鸡常可见到各种脏器的肿瘤变化,胸腺、脾脏、法氏囊等免疫器官的明显肿大或萎缩。也有很大一部分发病鸡仅表现为轻度消瘦,腺胃轻度肿胀或无明显异常,其它组织器官也未发现明显病变,但其生产性能明显下降,常规疫苗免疫效果不佳,给养禽业生产带来了巨大损失。

针对上述临床症状和病理变化,自 2000 年以来我们采用核酸探针杂交技术对来自全国包括台湾在内 11 个省份 42 个自然发病鸡群的 828 只鸡的组织样品进行了 MDV、CAV 和 REV 共感染的流行病学调查,以获得国内免疫抑制病分布状况的第一手资料,为指导生产提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 病料的收集与处理

从山东、河南、河北、北京、江苏、广东、广西、四川、吉林、辽宁、台湾 11 省 42 个不同鸡群收集临床有发病表现的 828 只病、死鸡的肝脏、脾脏、心脏、肾脏、胸腺、腺胃、法氏囊或羽毛囊等。对组织样品,各取 0.1g 研磨(如果是羽毛样品,则剪取 12 根羽毛囊根,每根约长 2mm),加入 0.5mL DNA 抽提缓冲液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 0.25 mmol/L EDTA, pH8.0, 0.5% SDS)和终浓度为 100  $\mu$ g/mL 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 消化过夜。次日,按常规方法提取组织 DNA,溶解于适量 TE 缓冲液中,即为样品 DNA。同时提取 SPF 鸡(由山东济南斯帕法斯 SPF 鸡场提供)相应组织的 DNA 作阴性对照。

### 1.2 探针的标记

型 MDV Md11 株 pp38 基因的特异性片段 PCR 产物用于标记 MDV 探针;REV SNV 株全基因组 cDNA 克隆用于标记 REV 探针;CAV Cux-1 株全基因组 DNA 克隆用于标记 CAV 探针。

将完全线性化的 REV 和 CAV 质粒 DNA 以及 MDV PCR 产物用苯酚氯仿抽提后,用乙醇沉淀,溶于 15  $\mu$ L 去离子水中,然后按以下步骤进行探针标记:模板 DNA 在 100 $^{\circ}$ C 水浴煮 10min,使模板 DNA 变性,立即置于 -20 $^{\circ}$ C 保存的冰冻乙醇中冷却 5 min;离心后将变性的模板 DNA 定容至 15.0 $\mu$ L,然后加入 2.0 $\mu$ L 六核苷酸引物,2.0 $\mu$ L dNTP 标记混合液,1.0 $\mu$ L Klenow 片断,37 $^{\circ}$ C 水浴 20h 以上;加入 2.0 $\mu$ L 0.2mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应;加入 2.5 $\mu$ L 4mol/L LiCl 和 75 $\mu$ L 无水乙醇,充分混合;置 -20 $^{\circ}$ C 2h 沉淀探针;12 000r/min 离心 10min 沉

淀探针,用 70%乙醇洗涤,充分干燥;将探针 DNA 溶于 50 $\mu$ L TE Buffer (pH8.0) 中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 应用斑点杂交法检测 MDV、CAV、REV

1.3.1 DNA 含量的测定:取一定量板(1%琼脂糖凝胶+适量溴化乙锭),用 DL2000 Marker 倍比递进稀释作对照,各取样 1 $\mu$ L 点板,吸收后,用凝胶成像系统根据亮度判定样品 DNA 含量。所有样品中 DNA 含量均大于每微升 0.2 $\mu$ g。

1.3.2 点样:将 3 张适当大小硝酸纤维素膜(NC 膜)作好标记,取样品在 3 张膜上各点 1 $\mu$ L。已知含有 MDV、CAV、REV 核酸的相应组织 DNA 作阳性对照,用 SPF 鸡相应组织的 DNA 作阴性对照。将 NC 膜(点样面朝上)放于已用变性液(0.5mol/L NaOH, 0.5mol/L NaCl)饱和的双层滤纸上变性 10min,放于中和液(0.5mol/L Tris-HCl, 1.5mol/L NaCl, pH7.4)饱和的双层滤纸上中和 10min,室温下自然干燥 30min,然后在 80 $^{\circ}$ C 烤 2h 以固定 DNA。

1.3.3 杂交反应:将 NC 膜放入预杂交液(5 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 1mmol/L EDTA, pH8.0)中,于 68 $^{\circ}$ C 反应 2h,其间经常摇动 NC 膜,然后分别在含有 Dig-标记的 MDV、CAV、REV 核酸探针的杂交液中 68 $^{\circ}$ C 杂交过夜;放入洗涤液(1 $\times$ SSC, 0.1% SDS)中于室温下洗涤 2 $\times$ 15min;放入洗涤液(0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS)中于 68 $^{\circ}$ C 洗涤 2 $\times$ 15min;在缓冲液 I(0.1mol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, pH7.5)中洗 1min;在缓冲液(缓冲液中加入 0.5%封闭试剂)中于室温反应 30min 进行封闭,用缓冲液洗涤 1min;在 20mL 缓冲液中加入 4 $\mu$ L 碱性磷酸酶标记的抗 Digoxigenin 抗体,37 $^{\circ}$ C 反应 30min;用缓冲液洗膜 5 $\times$ 5min;在缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 0.05mol/L MgCl<sub>2</sub>, pH9.5)中平衡 30min;10mL 缓冲液中加入 40 $\mu$ L NBT 及 35 $\mu$ L BCIP,将 NC 膜浸入其中避光显色过夜,清水终止反应。

## 2 结果

### 2.1 3 种病毒的核酸探针杂交检测结果

经过特异性核酸探针检测,在 828 只鸡的样品中,MDV 阳性为 695 只,REV 阳性为 505 只,CAV 阳性为 474 只。部分样品经过 MDV、REV、CAV 特异性核酸探针检测后显色结果分别见图 1、图 2、图 3。

### 2.2 3 种病毒单一及混合感染情况

828 只自然发病鸡中,有 370 只发生 MDV、REV 和 CAV 的三重感染,258 只发生了二重感染,

127 只发生了单重感染,仅有 73 只为阴性;42 个被检鸡群中的 29 个存在三重感染,8 个鸡群存在二重感染,3 个鸡群只检测到 MDV,仅有 2 个鸡群未检测到这三种病毒。3 种病毒感染状态的具体数字和比例见表 1。

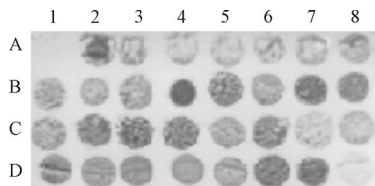


图 1 部分样品 MDV 核酸探针检测结果

Fig. 1 Detection of some samples by MDV dot blot hybridization

A1 ,Negative Control ;A2 ,Positive Control ;A3-D8 ,Samples.

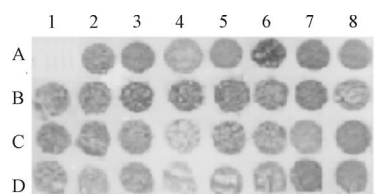


图 2 部分样品 REV 核酸探针检测结果

Fig. 2 Detection of some samples by REV dot blot hybridization

A1 ,Negative Control ;A2 ,Positive Control ;A3-D8 ,Samples.

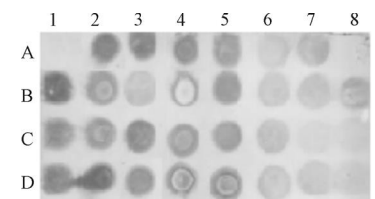


图 3 部分样品 CAV 核酸探针检测结果

Fig. 3 Detection of some samples by CAV dot blot hybridization

A1 ,Negative Control ;A2 ,Positive Control ;A3-D8 ,Samples.

表 1 828 只自然发病鸡中 3 种病毒感染状态

Table 1 Infectious proportion of MDV、REV or CAV in 360 samples

	Number	%	Number of field	%
MDV	107	12.92	3	7.14
REV	12	1.45	0	0
CAV	8	0.97	0	0
MDV + REV	136	16.43	3	7.14
MDV + CAV	100	12.08	5	11.90
REV + CAV	22	2.66	0	0
MDV + REV + CAV	370	44.69	29	69.05
Negative	73	8.82	2	4.76
Total	828	100	42	100

### 2.3 对山东某鸡场同一鸡群的跟踪检测结果

2001 ~ 2002 年,对山东某鸡场同一发病鸡群分

别在 125 日龄、180 日龄和 300 日龄进行的跟踪检测结果表明,同一鸡群中这三种病毒的感染率呈逐渐递增趋势,三种病毒的感染率曲线见图 4。

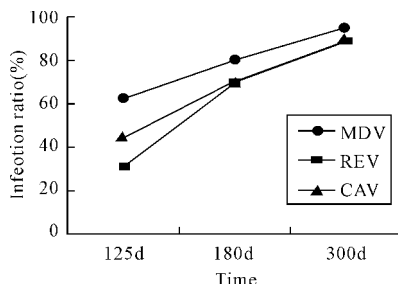


图 4 同一鸡群 MDV、REV、CAV 的感染率曲线

Fig. 4 The infection ratio curve of MDV、REV and CAV in one chicken flock

## 3 讨论

近年来,分子生物学的检测手段在动物病毒病的检测中得到了普遍的运用。相对于常规的病毒分离培养技术而言,PCR 技术和核酸探针杂交技术均大大提高了检出的灵敏度,但由于 PCR 反应过程中影响反应结果的因素太多,很容易导致假阴性及假阳性结果出现,而核酸探针杂交技术在灵敏度方面与 PCR 技术相当,但其可重复性与特异性更高,结果更加稳定可靠<sup>[1]</sup>。

自 2000 年以来我们采用核酸探针杂交技术对来自全国包括台湾在内 11 个省份临床有免疫抑制表现的 42 个自然发病鸡群的 828 只鸡的组织样品进行了 MDV、CAV 和 REV 共感染的流行病学调查,结果表明:发病鸡中这三种病毒的检出率均相当高,分别为 83.94% (MDV)、61.0% (CAV) 和 57.25% (REV);发病鸡中存在非常严重的二重感染(31.16%)和三重感染(44.69%),单重感染和阴性个体仅占 15.34% 和 8.82%;在 42 个鸡群中的 29 个存在 MDV、CAV 和 REV 的三重感染,占鸡群总数的 69.05%,5 个鸡群存在 MDV 和 CAV 的共感染,3 个鸡群存在 MDV 和 REV 的共感染,二重感染占鸡群总数的 19.05%,仅有 7.14% 的鸡群只检测到 MDV,4.76% 的鸡群未检测到这三种病毒。

从地域分布来看,十一个省份均检测到了 MDV、REV 和 CAV,表明了这三种病毒在我国的广泛分布。总体分析 MDV、REV 和 CAV 在自然发病鸡群中的感染率随年份变化不大,这说明 MDV、REV 和 CAV 这三种病毒在我国的广泛分布已有相当长的时间,并且已经达到某种分布的均衡状态。但连续三次对山东某鸡场同一鸡群进行的跟

踪检测结果表明,同一鸡群中这三种病毒的感染率呈逐渐递增趋势。

42 个鸡群共包括了 AA 肉鸡、AA 肉种鸡、海赛克斯、褐佳、海兰褐、海兰灰、新红黑、罗曼蛋鸡、青脚麻鸡、快青麻、优黄、土三黄,以及台湾、江苏、广西、山东等地的地方土鸡品种,检测结果表明不同品种发病鸡 MDV、REV 和 CAV 三种病毒的检出率均相当高,但三种病毒的感染在同一品种的不同鸡群中差别非常大,显示感染与品种之间无明显相关性。

近年来,在我国鸡群中 MDV 引起的感染仍时有发生,同以往不同的是,这种感染的发生常常伴有 REV 和 CAV 等其它疾病的混合感染<sup>[2,3]</sup>。42 个鸡群中的 40 个检测到了 MDV,尽管其中 12 个鸡群曾进行过 MDV 型弱毒疫苗的免疫,而用核酸探针杂交技术并不能区分 MDV 型强毒株和弱毒疫苗株,但我们在对这 12 个鸡群中的 7 个进行病毒分离时,均得到了区别于疫苗株的 MDV 野毒株,这也表明了 MDV 野毒株感染的普遍存在。REV 和 CAV 的检出率之高(分别为 32/42 和 34/42)则有些出乎意料,究其原因可能由于 CAV 和 REV 不仅能横向接触传染,而且可通过鸡蛋垂直传染。而我国多年来一直普遍使用非 SPF 鸡胚生产的弱毒疫苗造成的 CAV 和 REV 的污染和鸡群感染可能是二者普遍存在的主要原因。

近年来,鸡群肿瘤病的发生原因及临床表现与病理变化越来越复杂<sup>[2,3]</sup>。我国出现的以腺胃高度肿胀为特征的所谓传染性腺胃病,虽然对其病因众说不一<sup>[4-9]</sup>,但很多时候是由于腺胃发生肿瘤病变而表现出来的腺胃高度肿胀。由于 MDV 和 REV 单独感染就可以导致肿瘤病变并极有可能表现为腺胃的肿大,二者协同或与 CAV 协同作用导致更加明显的肿瘤病变也已被实验证实,而在本研究所检测的众多的腺胃出现典型肿大的病鸡组织样品中,MDV、REV 和 CAV 的双重感染和三重感染是普遍存在的。近年来免疫抑制性病毒混合感染的病例越来越多<sup>[11-15]</sup>,本试验对 MDV、CAV 和 REV 三种病毒的检测结果表明:MDV、CAV 和 REV 等免疫抑

制性病毒在生产鸡群中的混合感染是导致当前我国养禽业生产性能下降、条件致病性疾病发生严重、临床腺胃肿大症状发生的重要原因。

## 参考文献

- [1] 秦爱建,崔治中, Tannock A G,等. 三种不同方法检测鸡马立克氏病毒的效果比较[J]. 扬州大学学报(自然科学版),1998,1(1):9-12.
- [2] 张 志,崔治中,姜世金. 从 J 亚群禽白血病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.
- [3] 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.
- [4] 王永坤,朱国强,田惠芳,等. 鸡传染性腺胃病的研究[J]. 江苏农学院学报,1996,17(1):54.
- [5] 王永玲,王玉东,张子春,等. 鸡腺胃型传支病毒(QX 株)与呼吸型及肾型毒株力化特性的比较[J]. 中国兽医杂志,1998,24(1):12-13.
- [6] 朱国强,庄国宏,周祖宏,等. 鸡腺胃型 IBV 分离株血凝特性初探[J]. 中国兽医杂志,1997,23(1):11-12.
- [7] 周继勇. 传染性腺胃炎病毒 ZI971 株的一些生物学特性[J]. 畜牧兽医学报,2000,31(3):229-234.
- [8] 杜元钊,吴延功,朱万光,等. 从表现腺胃炎的病鸡分离到 1 株网状内皮增生症病毒[J]. 中国兽医学报,1999,19(5):434-436.
- [9] 姜北宇,刘日焕,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.
- [10] Page R K, Fletcher D J, Rowland G N, et al. Malabsorption syndrome in broiler chickens [J]. Avian Dis, 1982, 26: 618-624.
- [11] 姜世金,田夫林,崔治中. 传染性腺胃炎发病鸡中 MDV、REV、CAV 共感染的检测[J]. 中国兽医杂志,2004,40(4):10-12.
- [12] 姜世金,张 志,孙淑红,等. 用斑点杂交法同时检测鸡群中的 CAV、MDV 和 REV[J]. 中国兽医杂志,2003,39(5):6-8.
- [13] 金文杰,崔治中,刘岳龙,等. 传染性法氏囊病病料中 MDV、CAV 和 REV 的共感染检测[J]. 中国兽医学报,2001,21(2):6-9.
- [14] 崔治中. 我国鸡群中免疫抑制性病毒多重感染的诊断和对策[J]. 动物科学与动物医学,2001,18(4):19-22.
- [15] 崔治中. 免疫抑制性病毒多重感染在鸡群疫病发生和流行中的作用[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(5):417-421.