

一例禽腺病毒感染的病例诊断

史荣华¹, 颜彩霞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, 江苏扬州 225009)

摘要 2018年4月, 山东省某肉鸡场发生某种疾病, 日死亡率达5%, 临床剖检主要病变为心包积液, 出血性肝炎, 肾脏肿大。为了明确患病肉鸡死亡的原因及确定病原, 无菌采取肝脏、肾脏等病变组织, 开展了病毒分离, PCR检测和组织病理学观察等实验室诊断。结果表明, 病料接种鸡胚, 鸡胚有明显的肝出血症状, PCR扩增产物测序结果与已发表的血清4型禽腺病毒 Hexom 基因同源性为99%, 组织病理学观察发现肝细胞核内形成嗜碱性包涵体。上述结果表明该分离株为血清4型禽腺病毒。

关键词 肉鸡; 腺病毒; 诊断

中图分类号 S855.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)30-0086-03

Diagnosis of a Case of Avian Adenovirus Infection

SHI Rong-hua, YAN Cai-xia, ZHANG Jian-jun et al (Sinopharm Yangzhou VAC Biological Engineering Co. Ltd., Yangzhou, Jiangsu 225127)

Abstract In April 2018, a certain disease occurred in a broiler farm in Shandong Province. The daily mortality rate was 5%. The main clinical manifestations were pericardial effusion, hemorrhagic hepatitis and kidney enlargement. In order to find out the cause of death and determine the pathogen of broiler disease, aseptic liver, kidney and other pathological tissues were used to conduct laboratory diagnosis of virus isolation, PCR detection and histopathology. Chicken embryos inoculated with the diseased material showed obvious hepatorrhagic symptoms. The sequencing results of PCR amplified products showed 99% homology with the published serotype 4 avian adenovirus Hexom gene. Histopathological observation showed that basophilic inclusion bodies were formed in the nuclei of the liver. The above results indicated that the isolate was serum type 4 FAdV.

Key words Table poultry; Adenovirus; Diagnosis

禽腺病毒(Fowl Adenovirus, FAV)属于腺病毒科禽腺病毒属, 大多数能在健康鸡、鸭、鹅等禽类体内存在且复制, 一般呈隐性感染^[1]。禽腺病毒分为I、II和III 3个群, 其中I群禽腺病毒(Fowl Adenovirus Group I, FAV-I)具有共同的群抗原, 分为5个种、12个血清型^[2]。世界各地均有报道, FAV急性感染主要表现为包涵体肝炎、心包积液以及肌胃糜烂等症状^[3]。2018年4月山东某肉鸡场发生的疑似禽腺病毒感染鸡群, 临床表现为心包中有淡黄色清亮液体, 肝脏肿大, 表面有出血点, 经实验室病毒分离与鉴定为血清4型禽腺病毒感染。

1 材料与方法

1.1 病料采集 病料来源于山东省某鸡场, 34日龄AA肉鸡, 剖检疑似禽腺病毒感染, 无菌采集具有典型病变的肝、脾、肾等病料组织用于病毒分离以及组织病理学观察。

1.2 试验材料 SPF鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 由国药集团扬州威克生物工程有限公司实验室孵化及饲养。

DNA提取纯化试剂盒购自上海凯杰公司, 2×Easy Taq-SuperMix, 普通琼脂糖凝胶购自北京金式金生物技术有限公司, DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, 根据GenBank中I群禽腺病毒的Hexom基因序列保守区, 设计合成引物, F: 5'-AATTTCCACCCCATGACGCGCCAGG-3'; R: 5'-TGGCGAAAGGCGTACGGAAGTAAGC-3', 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。其他试剂均为国产试剂。

1.3 病毒分离 采集病鸡肝、脾、肾等病变组织, 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^[4], 经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌, 卵黄囊接种5个7日胚龄的SPF鸡胚, 置37℃温箱孵育。每12h照胚1次, 将24h内死亡鸡胚弃去, 24h后死亡鸡胚收取尿囊液并观察胚体是否病变, 7d后存活的鸡胚, 置4℃冻死, 收取尿囊液并观察胚体是否病变。

1.4 血凝试验 取30 μL收集的尿囊液用生理盐水在血凝板中先进行倍比稀释2¹¹, 随后每孔加入30 μL 1%鸡红细胞; 置37℃反应10 min。若样品孔出现鸡红细胞凝集现象, 则判定为有血凝性; 反之则为血凝阴性。

1.5 PCR检测 用DNA提取试剂盒抽提鸡胚尿囊液中的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2.0 μL, 2×Easy TaqSuper-Mix 12.5 μL, ddH₂O 8.5 μL, 上游引物和下游引物各1.0 μL。反应程序为: 95℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 55℃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, 阳性样品送南京金斯瑞物科技有限公司进行序列测定, 并将测定序列与GenBank上已发表FAdV核苷酸序列进行同源性比对。

1.6 病理组织学检测 取病死鸡的肝脏等组织用福尔马林固定, 按文献方法^[5]制作石蜡切片, 苏木精-伊红染色, 染色后进行组织病理学诊断。

2 结果与分析

2.1 病鸡剖检症状 对现场病死鸡进行剖检发现, 主要表现为肝脏表面有大量出血点和出血斑(图1A), 包心, 内含黄色积液(图1B)。

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。

收稿日期 2018-06-11

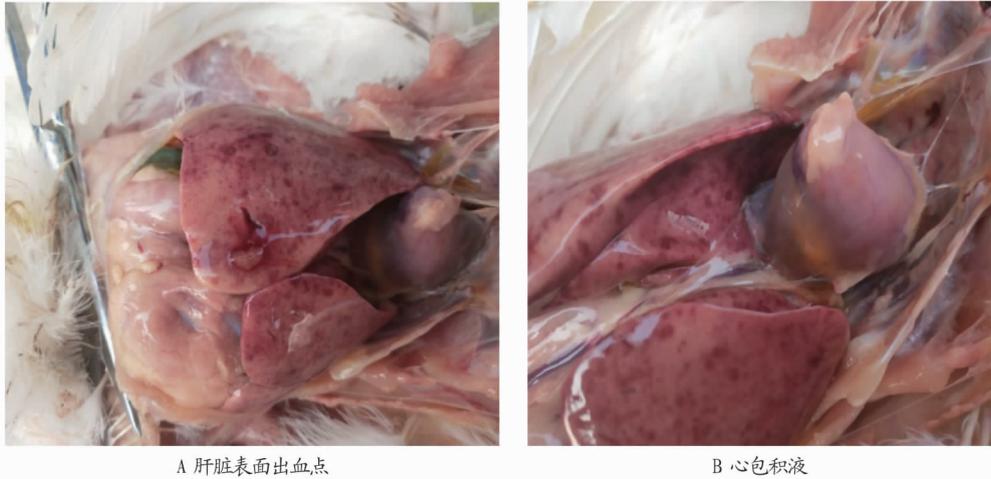
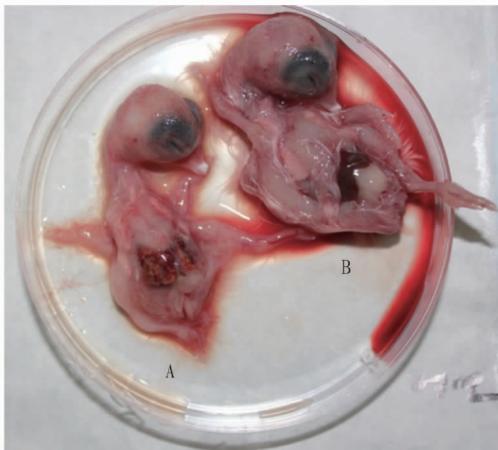


图 1 病死鸡组织病变

Fig.1 Pathological changes of dead chicken

2.2 病毒分离 SPF 鸡胚在接种病料后,96 h 内死亡 2 个,120 h 内死亡 2 个,血凝试验结果表明收获的尿囊液没有血凝性,排除了流感和新城疫病毒的感染。接种病料死亡的鸡胚出现明显的病变,主要表现为胚体出血,肝脏呈黄色,有明显的出血点(图 2)。



A. 病变鸡胚 B. 正常鸡胚

图 2 接种鸡胚病变

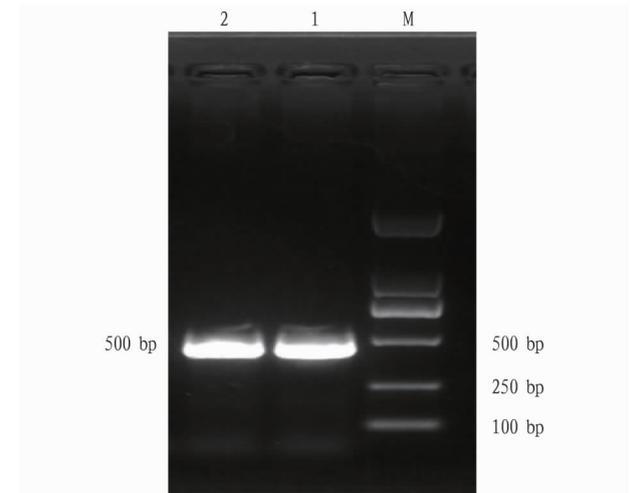
Fig.2 Pathological changes of inoculated chicken embryo

2.3 PCR 鉴定和序列分析 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,扩增出的目的条带与预期设定的腺病毒阳性对照的条带相符,大小约为 500 bp(图 3)。测序结果表明,此病毒分离株的基因序列与 Genbank 已发表 4 型 FAdV 序列同源性达 99%,从而确定为血清 4 型 FAdV。

2.4 组织病理学检测 组织病理学显示:肝细胞明显减少,大量肝细胞变性、坏死(图 4A);肝细胞内可见嗜碱性包涵体(图 4B)。

3 结论与讨论

FAdV-I 主要侵害 3-8 周龄的肉鸡,病死率最高可达 80%。FAdV 既可通过种蛋垂直传播又可通过病鸡水平传播^[6]。I 群禽腺病毒分为 12 个血清型,其中在白羽肉鸡上 4 型和 8b 型禽腺病毒流行最为广泛,4 型主要表现为心包积水



注:M.DL2000 DNA Marker;1.腺病毒阳性对照;2.病毒 DNA 的 PCR 扩增产物

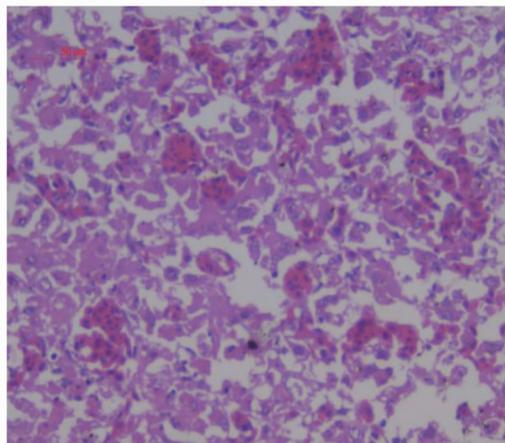
Note:M.DL2000 DNA Marker;1.Adenovirus positive control;2.PCR amplification products of virus DNA

图 3 PCR 鉴定结果

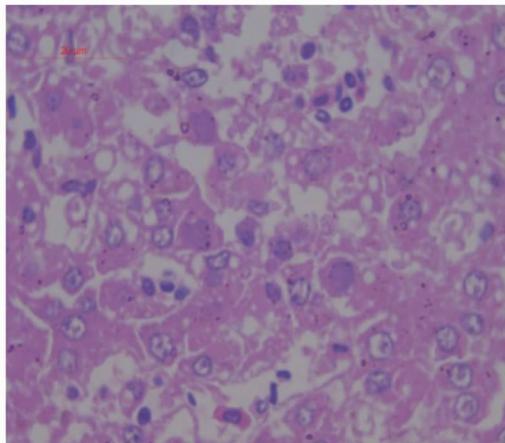
Fig.3 PCR identification results

综合征,而 8b 型则主要表现为包涵体肝炎^[7]一些免疫抑制病,如传染性法氏囊病和传染性贫血病等混合感染会加剧家禽的发病和死亡^[8]。2014—2016 年该病在我国发病范围广泛,给养禽业造成了巨大损失。

该试验从山东省某肉鸡场采集病料,根据临床解剖病变,病毒分离、血凝试验、PCR 扩增及其产物序列分析、病理组织学分析,最终确诊该病例为禽 4 型腺病毒感染。针对此种腺病毒感染一方面疫苗预防是有效的方法,另一方面做好环境的消毒工作,减少病原的传播。一旦鸡群发病无特效药物,可增加营养和改善环境以增强体质提高抗病能力,同时添加适量抗生素防止继发感染。死亡率逐渐增大的鸡群可以紧急注射特异性高免血清或卵黄抗体。因该病目前无明确的致病机理,建议使用疫苗进行防控,选择合适血清型灭活疫苗给健康鸡群进行免疫预防,能达到 90% 以上的保护



A 肝细胞变性、坏死



B 肝细胞内嗜碱性包涵体

图4 肝脏病理变化

Fig.4 Pathological changes of liver

效果。其中在肉鸡上,5~7日龄和21日龄左右进行灭活疫苗的接种,可很好控制该病的发生。该鸡场发病后选择紧急注射腺病毒卵黄抗体并适当添加抗生素进行治疗,加强鸡舍通风消毒,死亡率下降显著,7d后鸡群稳定,几乎未见死亡病鸡。

参考文献

- [1] 罗思思,谢芝勋,邓显文,等.1群禽腺病毒分离鉴定及 hexon 基因的序列分析[J].畜牧与兽医,2012,44(1):52-56.
- [2] 窦砚国,郑肖强,陈浩,等.鸡源血清4型禽腺病毒的分离鉴定[J].中国兽医学报,2012,37(6):1036-1040.

- [3] 梁广成,高巍,谢泉,等.一株高致病性血清4型禽腺病毒的分离与鉴定[J].中国家禽,2016,38(19):25-28.
- [4] 杨振,董昌海,李甜甜,等.四株1群禽腺病毒的分离与鉴定[J].中国家禽,2017,39(19):73-76.
- [5] 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.
- [6] MUHAMMAD KASHIF SALEEMI,张贤群.预防心包积水综合征所造成的损失[J].国外畜牧学:猪与禽,2010,30(5):29-31.
- [7] 塞弗.禽病学[M].11版.苏敬良,高福,索勋,译.北京:中国农业出版社,2005.
- [8] 李晓林,王相芹,罗济冠,等.1群禽腺病毒的分离鉴定及其致病性研究[J].中国动物检疫,2016,33(8):86-89.

(上接第76页)

3 结论与建议

石狮市建设用地节约集约水平较高,近3年来节约集约利用水平有下降趋势,主要为管理绩效和增长耗地指数下降明显,至少应在以下方面加以改进,进一步提升节约集约用地水平。

(1) 石狮市应当进一步控制每年新增建设的用地量,严格控制建设用地规模的扩张速度,一方面可以促进石狮市的土地利用总体规划的实施,另一方面防止其土地粗放利用趋势加重。

(2) 调整优化产业布局及产业结构。继续发展原有优势的服装纺织等劳动密集型产业,吸纳劳动人口集聚;加强原有优势基础产业和基础设施建设的升级改造,加快第三产业发展,提高单位建设用地产出,进一步提高石狮市建设用地的利用强度。

(3) 盘活存量建设用地。继续推进低效用地开发利用工作,对存量建设用地进行全面核查,科学制定用地改造计划,并通过加快项目审批速度、收回、收购、调整、清理、置换、整合等经济或行政手段,分门别类地进行盘活,提高建设用地利用效率。

(4) 提高建设用地产出强度。通过节约集约用地政策倒逼产业升级,优化产业结构,提高建设用地产出强度,推进石狮市的经济发展从以粗放型为主转向以集约型为主、从以总

量为主转向以结构为主;通过政策方式等引导人口聚集、不断提高单位建设用地的投入及产出、盘活存量土地、加强建设用地内部挖潜等措施加强对建设用地的合理利用,以此形成良性循环,进一步提高建设用地的节约集约利用水平,实现土地利用与社会经济的可持续发展。

参考文献

- [1] 王静,邵晓梅.土地节约集约利用技术方法研究:现状、问题与趋势[J].地理科学进展,2008,27(3):68-74.
- [2] 周克昊,刘艳芳,谭荣辉,等.区域建设用地节约集约利用评价理想值确定:以武汉市为例[J].国土资源科技管理,2013,30(1):57-64.
- [3] 曹银贵,袁春,周伟,等.基于主成分分析的全国建设用地集约度评价[J].生态环境,2008,17(4):1657-1661.
- [4] 姜海,曲福田.县域建设用地集约水平影响因素计量分析:以江苏省为例[J].中国土地科学,2008,22(8):4-10.
- [5] 潘润秋,夏商周,陈晨.基于聚类分析的开发区土地集约利用评价指标理想值确定研究:以湖北省开发区为例[J].地理与地理信息科学,2015,31(4):55-59.
- [6] 赵丽红,陈文波,邵虹.南昌市中心城区城市建设用地集约利用特征及空间相关性分析[J].长江流域资源与环境,2015,24(8):1286-1292.
- [7] 王振山,张绍良,贾蓉,等.城镇建设用地集约利用评价研究:以宁夏平罗县城为例[J].宁夏大学学报(自然科学版),2017,38(4):388-392,401.
- [8] 陈颖,吴柏清,邹卓阳.基于信息熵的资阳市建设用地节约集约利用评价研究[J].国土与自然资源研究,2010(4):1-4.
- [9] 王国杰,吕忠杰,杨生德,等.基于GIS的城市建设用地节约集约利用评价系统研究[J].地理信息世界,2013,20(6):49-53.
- [10] 中华人民共和国国土资源部.建设用地节约集约利用评价规程:TD/T 1018—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [11] 中华人民共和国国土资源部.建设用地节约集约利用评价操作手册[M].北京:中华人民共和国国土资源部,2014.