

史荣华,周 扬,颜彩霞,等. 1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):156-159.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.031

1 例蛋鸡腺病毒感染的诊断及对 SPF 鸡的致病性

史荣华¹,周 扬¹,颜彩霞¹,杨 瑞¹,张建军¹,李一民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 11 月,山东省某蛋鸡场 80 日龄左右鸡群出现采食下降、精神沉郁、消瘦等症状,日死亡率达 1%,临床剖检病变主要为心包积液、肝脏有出血点、肾脏肿大等。为明确患病蛋鸡死亡原因及确定病原,无菌采取病死鸡肝脏、肾脏等,并展开病毒分离、PCR 检测等实验室诊断,结果表明,病料接种鸡胚,胚体有明显出血症状,肝脏有出血点,PCR 扩增产物测序结果与已发表的血清 4 型禽腺病毒 *Hexom* 基因同源率为 99%。上述结果表明,该分离株为血清 4 型禽腺病毒。将分离到的腺病毒对 2 周龄 SPF 鸡进行攻毒试验研究其致病性,每日观察鸡的精神状态,记录死亡情况,发现胸肌接种 0.3 mL/羽的病毒剂量对 SPF 鸡的致死率高达 100%,死亡时间在 72~144 h;对死亡鸡剖检均可见明显的心包积液,肝脏出血坏死;组织病理学观察发现肝细胞核内形成嗜碱性包涵体。

关键词:蛋鸡;腺病毒;诊断;致病性

中图分类号:S858.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)06-0156-04

禽腺病毒(fowl adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,分为 I、II 和 III 3 个群,其中 I 群禽腺病毒(fowl adenovirus group I, FAdV-I)具有共同的群抗原,依据其分子结构特征分为 5 个群(A~E)、12 个血清型^[1-2]。FAV 急性感染主要表现为包涵体肝炎、心包积液及肌胃糜烂等症状^[3]。该病多发于肉鸡、肉杂鸡,近期也开始感染产蛋鸡的育成鸡,并且育成鸡发病死亡率还比较高。2018 年 11 月山东某蛋鸡场发生的疑似禽腺病毒感染鸡群,临床表现为心脏包膜中有淡黄色液体,肝脏表面有出血点,经实验室病毒分离与鉴定为血清 4 型禽腺病毒感染。分离到的病毒对 SPF 鸡的临床致死率很高,表现症状典型。

1 材料与方法

1.1 病料信息

病料来源于山东省某蛋鸡场,80 日龄海兰蛋鸡,剖检疑似禽腺病毒感染,无菌采集具有典型病变的肝、脾、肾等组织用于病毒分离。

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 TaqSuperMix,普通琼脂糖凝胶购自北京全式金生物技术有限公司,DL 2000 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′-AATTTTCGACCCCATGACGCCAGG-3′; R: 5′-TGGCGAAAGGCGTACGGAAGTAAGC-3′,引物由华大基因公司合成,其他试剂均为国产试剂。

收稿日期:2019-01-29

作者简介:史荣华(1987—),男,江苏泰州人,硕士研究生,主要从事病毒免疫学研究。E-mail:692745288@qq.com。

学杂志,2009,21(1):90-92.

[4]米建华,于 波,王光宝. EMB 琼脂中伊红美蓝适宜配比的选择[J]. 微生物学通报,1982,9(5):233-235.

[5]杨更发,魏兰芬,许 激,等. 沙门氏菌-志贺氏菌培养基的质量研究[J]. 预防医学情报杂志,2000(1):54-55.

[6]李明珠,李 辉,王 丹. 乳饮品中耐胃酸乳酸菌的分离鉴定与筛选[J]. 中国酿造,2014,33(9):42-44.

[7]李圣杰,丁 轲,姜芳芳,等. 鸡源高产淀粉酶丁酸梭菌的分离鉴

定[J]. 中国畜牧兽医,2015,42(11):3073-3079.

[8]万荣峰,江善祥. 3 株乳酸菌体外拮抗致病性大肠杆菌试验[J]. 畜牧与兽医,2007,39(3):50-52.

[9]陈 丹,宋振辉,秦定红,等. 一株干酪乳杆菌的分离鉴定及其对禽致病性大肠杆菌的拮抗作用[J]. 畜牧与兽医,2017,49(12):83-86.

[10]谢树贵,戴 青,赵述森,等. 酒窖底泥中丁酸梭菌的分离及其特性研究[J]. 微生物学通报,2007,34(6):1047-1051.

1.3 病毒分离

采集病死鸡肝、脾、肾等病变组织,按 1:5 加入含适当浓度抗生素的灭菌 8.5% 生理盐水,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 d 胚龄的 SPF 鸡胚,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育。照胚 1 次/12 h,将 24 h 内死亡鸡胚弃去,24 h 后死亡鸡胚收取尿囊液并观察胚体是否病变,7 d 后存活的鸡胚,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 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;置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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

采用 DNA 提取试剂盒抽提鸡胚尿囊液中的 DNA,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times Easy Taq Super 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 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延

伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 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生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 对 SPF 鸡的致病性试验

2 周龄 SPF 鸡以 0.3 mL/只的剂量胸肌接种该分离病毒,每日观察鸡的精神状况、采食量、发病情况,记录死亡时间,计算死亡率,死亡鸡剖检记录眼观病变,连续观察 10 d。

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

2 结果

2.1 病鸡剖检症状

对现场病死鸡进行剖检发现,主要表现为包心,内含黄色积液(图 1-A),肝脏表面有大量出血点(图 1-B)。



A. 包心, 内含黄色积液



B. 肝脏表面有大量出血点

图1 病死鸡组织病变

2.2 病毒分离

SPF 鸡胚在接种病料后,144 h 内全部死亡,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感染的可能。接种病料死亡的鸡胚出现明显病变,主要表现为胚体出血,肝脏呈黄色,有明显的出血点(图 2)。

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 对 SPF 鸡的致病性试验结果

SPF 鸡攻毒后,前 3 d 无明显症状,4 d 时开始出现采食量下降,精神沉郁,144 h 内全部死亡,剖检主要表现为包心,内有淡黄色清亮液体(图 4-A);肝脏发黄、表面有散在出血点(图 4-B),肾脏肿大(图 4-C)。

2.4.1 发病 SPF 组织病理学检测 组织病理学显示,肝细胞内可见嗜碱性包涵体(图 5-A、图 5-B)。

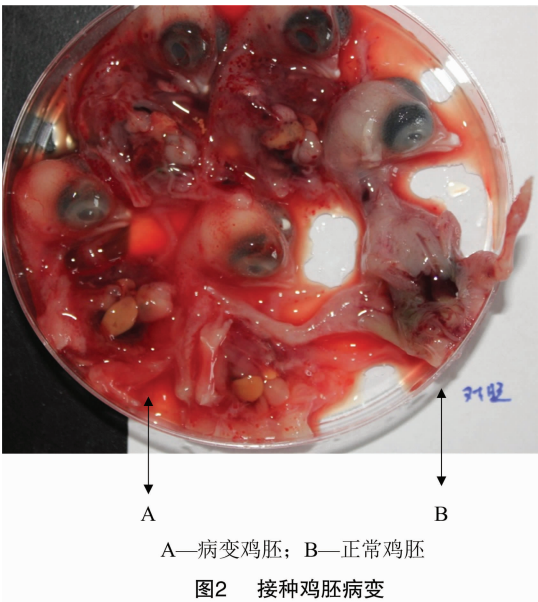
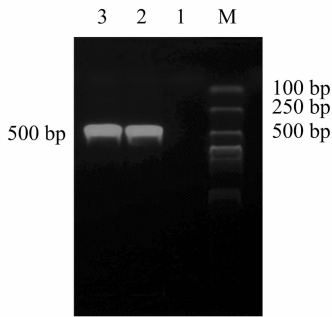


图2 接种鸡胚病变

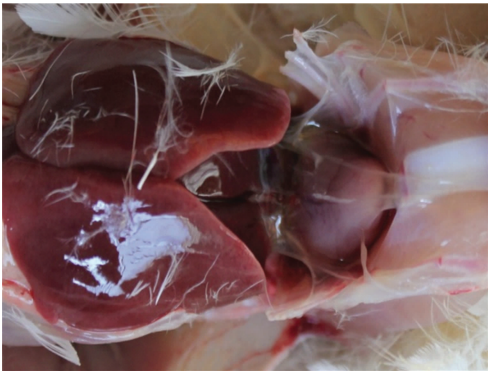


M—DL 2 000 DNA Marker; 1—阴性对照;
2—腺病毒阳性对照; 3—病毒 DNA 的 PCR 扩增产物

图3 PCR鉴定结果

3 讨论

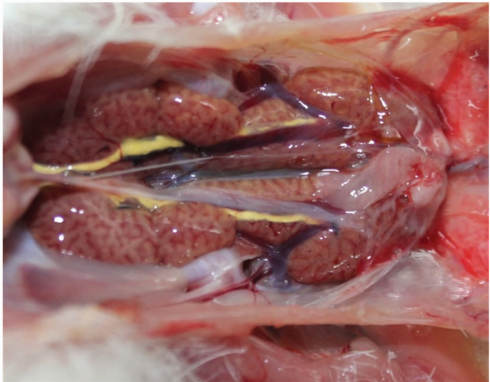
I 群禽腺病毒 (fowl adenovirus, FAdV - I) 广泛存在于多种禽类的消化道和呼吸道中,一般不表现临床症状,但在一定条件下作为继发病原引起鸡群发病和死亡^[6]。2014—2016 年该病在我国发病



A. 包心, 内有淡黄色清亮液体



B. 肝脏发黄、表面有散在出血点

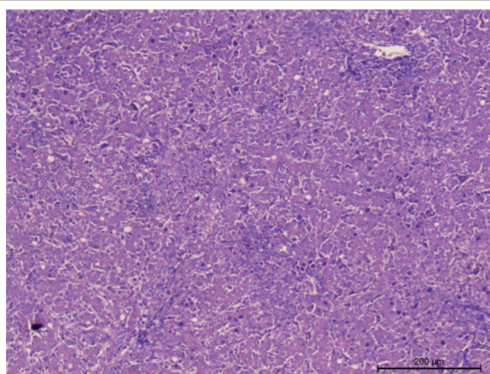


C. 肾脏肿大

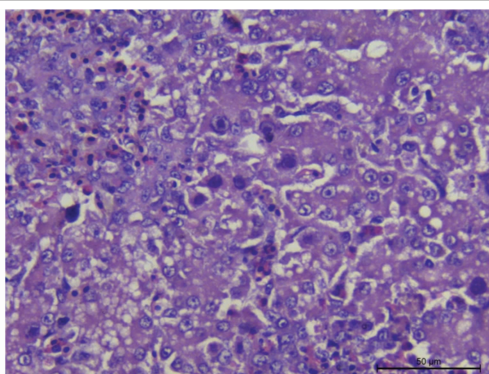
图4 SPF 鸡的病变

范围广泛,给养禽业造成了巨大损失^[2]。FAdV - I 主要侵害 3 ~ 8 周龄的肉鸡、蛋鸡青年鸡、黄鸡及麻鸡,病死率最高可达 80%,临床主要表现为心包积水综合征 (HPS) 和包涵体肝炎 (IBH)。FAdV 既可通过种蛋垂直传播又可通过病鸡水平传播,但以垂

直传播为主^[7]。I 群禽腺病毒分 12 个血清型,其中在蛋鸡、蛋种鸡上 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综合征,而 8b 型则主要表现为包涵体肝炎^[8]。临床病例显示,一些免疫抑制病如传染性法氏囊病 (IBDV) 和传染性贫血病



A. 肝细胞内嗜碱性包涵体



B. 肝细胞内嗜碱性包涵体

图5 肝脏病理变化

(CAV)等混合感染是禽腺病毒感染后发病率和死亡率加剧的一个重要因素^[9]。

本试验从山东省某蛋鸡场采集病料,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,最终确诊该病例为禽 4 型腺病毒感染,用分离的毒株对 SPF 雏鸡进行攻毒试验,致死率达到 100%,且均能发生与自然感染的剖检病鸡一致的病理变化,均可见肝脏发黄,有散在的出血点,心包内有淡黄色清亮液体,肾脏肿大。表明该分离的 FAdV 4 型毒株具有很强的致病性。

针对此种腺病毒感染,一方面疫苗预防是有效的方法,另一方面加强养禽场生物安全是预防和控制该病发生的关键。I 群禽腺病毒的 12 个血清型交叉保护性较差,因此在防控上必须选用与流行株匹配的疫苗株和卵黄抗体才能有效遏制疫情的蔓延^[10]。一旦鸡群发病无特效药物,可通过做好鸡舍卫生消毒工作,防止病毒的水平感染,补充微量元素和维生素及鱼肝油等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制,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 95% 以上的保护效果。其中在蛋鸡上,7~10 日龄和 40 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,1 周后鸡群稳定,几乎未见死亡病鸡,鸡群恢复健康后再选择灭活疫苗进行接种。本试验诊断为该鸡场下一步蛋鸡饲养的禽腺病毒感染预防和治疗工作起到一定参考作用。

参考文献:

- [1]周薇帆,陈田田,刘建勋,等. 1 株 I 群血清 4 型禽腺病毒对 SPF 鸡的致病性[J]. 中国兽医学报,2018,38(9):1666-1669.
- [2]史荣华,颜彩霞,张建军,等. 一例禽腺病毒感染的病例诊断[J]. 安徽农业科学,2018,46(30):86-88.
- [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 I 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]楚电峰,刘文亭,冯嫣芳,等. I 群禽腺病毒疫苗研究进展[J]. 中国家禽,2017,39(12):44-47.
- [7]Muhammad K S,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.
- [8]塞 弗. 禽病学[M]. 11 版. 北京:中国农业出版社,2005.
- [9]陈 玲,张 兵,宋亚芬,等. 禽腺病毒的分离鉴定及 LMH 细胞适应毒的生物学特性研究[J]. 中国兽药杂志,2018,52(6):1-6.
- [10]于洪涛,赵 丽,吕日辉. I 群 4 型禽腺病毒卵黄抗体效价与鸡攻毒保护相关性试验[J]. 营养与疾病,2018(2):45-47.