

混养乌鸡和麻鸡 J 亚群禽白血病病毒感染及变异分析

魏戎蓉, 蔡黎明, 申艳玮, 王言明, 成子强*

(山东农业大学 动物科技学院, 泰安 271018)

摘要: 2011年6月4日, 山东淄博某鸡场送检病例, 该养殖场养殖规模8万羽, 主要品种为乌鸡、麻鸡和海兰褐。乌鸡和麻鸡饲养在同一鸡舍, 各4000只。患病乌鸡与麻鸡在360日龄时, 表现为消瘦、嗜睡、鸡冠稍苍白, 死亡率达10%左右, 另一鸡舍的海兰褐鸡并无发病状况。通过大体剖检、组织病理学观察病变、血涂片观察血象, 并利用PCR技术鉴定病鸡病毒感染情况, 分离病毒, 对其进行测序, 分析病毒与参考毒株的同源性及变异情况。大体剖检可见肝、肾肿大, 胸肌出现纤维肉瘤, 肠管萎缩液化, 胰出现黄豆大小的肿瘤结节; 病理组织学观察发现乌鸡肝出现髓细胞瘤, 腿部形成动脉血管瘤, 肠管及胰腺间出现髓细胞瘤及血管瘤等, 麻鸡肝出现成红细胞瘤, 肺出现海绵状血管瘤。血涂片观察发现, 血液中出现髓细胞样瘤细胞, 中性粒细胞的数量和比例明显升高。病原学检测发现, ALV p27抗原和抗体检测均为阳性, PCR技术鉴定2种鸡均为ALV-J感染。分别从乌鸡和麻鸡中分离出1株和2株病毒, 与各参考毒株比较显示, gp85区氨基酸的相似性为82.3%~91.1%, 基因变异性较大, 说明混养鸡群感染ALV-J后, 不同宿主交叉感染, 可能会促使ALV-J进化。

关键词: J亚群禽白血病病毒(ALV-J); 乌鸡; 麻鸡; 病毒分离; 同源性分析

中图分类号: S852.659.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)01-0107-09

Virus Mutation Analysis of Avian Leukosis Virus Subgroup J in Infected Mixed Breeding Black-bone Silk Fowl and Ma-chicken

WEI Rong-rong, CAI Li-ming, SHEN Yan-wei, WANG Yan-ming, CHENG Zi-qiang*

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

Abstract: In June of 2011, sick chickens from a commercial flock at Zibo in Shandong Province were sent to our lab for inspection. The flock size is 80 000. Main species breed in the farm were Black-bone silk fowl (BSF), Ma-chicken and Hy-Line chicken. The BSF and Ma-chicken were reared in the same house, 4 000 each. The chickens were 360-day-old, and showed emaciation, listlessness, lethargy, pale comb. The mortality rate was about 10%. Hy-Line chickens in another house were not infected. Six of sick chickens were tested by gross, histopathology, blood smears observation and RT-PCR. The sequences of isolated viruses were analyzed by software. Necropsy observation showed enlargement of the liver and kidney, fibrosarcoma in chest, intestinal atrophy and liquefaction, soybean size of tumor nodules in pancreas. Histopathology observation showed that myelocytoma presented in the liver and arterial, and aneurysm existed in the leg. Fibrosarcoma appeared on the pectorales in BSF. Erythroblastoma of liver, spongy hemangioma of lungs were showed in Ma-chickens. Blood smear observation showed the occurrence of myeloid cell-like tumor cells, the number of neutrophils was significantly increased. Pathogen detection showed that ALV p27 antigen and antibody were both positive. The two kinds of chickens were both ALV-J positive in detection of RT-PCR. One and two strains of ALV-J were isolated from BSF

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 国家自然科学基金(31072096); 山东省农业重大应用科技创新课题(31700)

作者简介: 魏戎蓉(1989-), 女, 内蒙古乌兰浩特市人, 硕士, 主要从事分子病理学研究, E-mail: leng.lengaaa@163.com

* 通信作者: 成子强, 教授, E-mail: czqsd@126.com

and Ma-chicken, respectively. Comparing with the reference strains, the homologies of gp85 protein amino acid sequence were ranged from 82.3%–91.1%, suggesting greater genetic variability. It indicated that different host cross infection might happen and promote the rapid evolution of virus when mixed chickens infected with ALV-J.

Key words: avian leukosis virus subgroup J (ALV-J); black bone silk fowl; Ma-chicken; virus isolation; homology analysis

禽白血病病毒(avian leukosis virus, ALV)是一类反转录病毒^[1],主要引起禽各种造血细胞肿瘤性增生,根据病毒中和反应形式、宿主范围、囊膜特性及其他标准可将其划分为A~J 10个亚群^[2-4],临床上较常见的是A、B和J亚群感染病例,中国以J亚群禽白血病病毒感染最为严重。

J亚群禽白血病病毒首先是1998年L. N. Payne等^[5]在肉鸡中分离出来的,主要诱发鸡的髓细胞瘤性白血病。随后国内外对ALV-J进行了较深入研究,发现其它多种肿瘤(如纤维肉瘤、多发性血管瘤、成红细胞瘤)^[6-7]等也与ALV-J的存在有关。

早年中国肉鸡祖代鸡主要依赖进口,从国外引进白羽肉鸡后^[8-10],由于检测水平较低、防控意识不强,导致J亚群禽白血病在中国大范围暴发。1999年,杜岩等^[11]从商品代肉鸡中检测分离到ALV-J,从此中国开始了关于ALV-J的相关研究。2004年,B. Xu等^[12]检测中国北方12家商品蛋鸡场ALV-J致病情况,病鸡ALV-J抗原检测呈阳性。徐滨蕊等^[13]、王辉等^[14]也分别在2005年和2008年从蛋鸡中分离到ALV-J,成子强等^[15]在2005年首次于麻鸡中检测到J亚群禽白血病的发病情况。同年,崔治中等^[16]从黄鸡中也分离到ALV-J。ALV-J的宿主范围不断扩大,蛋鸡、麻鸡、黄鸡等中国地方品种鸡也成为易感品种。2011年6月,山东淄博某鸡场发生混养乌鸡和麻鸡疑似J亚群禽白血病,相关情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂及器材

TaqDNA聚合酶、dNTPs购自大连TaKaRa生物工程公司;PCR产物测序由北京华大基因公司完成;蛋白酶K购自华美生物工程公司;常规试剂和器材由山东农业大学动物科技学院分子病理实验室提供。

1.2 病料来源

2011年6月4日,山东淄博某鸡场送检病例,

该养殖场养殖规模8万羽,主要品种为乌鸡、麻鸡和海兰褐。乌鸡和麻鸡饲养在同一鸡舍,各4000只,死亡率达10%左右,另一鸡舍的海兰褐鸡并未发病。送检病鸡6例,360日龄,病鸡表现为消瘦、精神萎靡、嗜睡、鸡冠稍苍白。病鸡编号1、2、3、4、5、6,其中2、5、6号鸡为乌鸡,1、3、4号鸡为麻鸡。

1.3 试验方法

1.3.1 剖检病变观察 对送检病鸡进行外部检查,剖检,观察各脏器组织大体病变,并做好记录。

1.3.2 病理组织学观察 取肝、脾、肾、心、肺、小肠、腺胃、胰腺、大脑、小脑、坐骨神经、胸腺等组织,10%福尔马林液中固定,石蜡包埋、切片,HE染色(伊红和苏木素);采血制作血涂片,姬姆萨染色^[11-12]。光学显微镜下观察石蜡切片与血涂片。

1.3.3 ALV-J抗体检测 参照Avian Leukosis Virus Antibody Test Kit(美国IDEXX公司)说明书检测6例病鸡血清中的ALV-J抗体。

1.3.4 ALV-J的分离和鉴定

1.3.4.1 病毒培养:取生长状态良好的DF-1细胞传代,取鸡肾充分研磨后用超声波破碎90循环(每个循环工作时间3s、间隔时间2s),然后用0.22 μm的微孔滤器过滤,待细胞状态良好时(一般为4h)用处理好的病料感染DF-1细胞,在二氧化碳培养箱内作用2h后换细胞维持培养基,培养至少7d后分别取细胞上清和细胞备用。

1.3.4.2 ELISA检测ALV抗原p27:取1.3.4.1收集的上清,检测其ALV抗原p27,操作步骤按照Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit说明书进行。

1.3.4.3 提取前病毒基因组DNA:取1.3.4.1中细胞上清抗原为阳性的细胞,提取细胞DNA,具体步骤参照细胞DNA提取试剂盒说明书。

1.3.4.4 ALV-J、REV和MDV的PCR检测^[13-14]:根据文献报道^[15]合成特异性的ALV-J、MDV和REV的鉴定引物、引物序列及目的片段(表1),引物由北京华大基因生物技术服务公司合

成;提取 p27 抗原阳性细胞 DNA,作为 PCR 模板。PCR 反应采取 25 μL 体系,反应体系:细胞总 DNA 1 μL , 10 \times Taq Buffer 2.5 μL , LA Taq 1 μL , 1dNTP 2.5 μL (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 上下游引物各 1 μL , 补加水至 25 μL ; ALV-J 的 PCR 反应条件:94

$^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;MDV 与 REV 的 PCR 反应条件,退火温度分别更改为 50 $^{\circ}\text{C}$ 和 55 $^{\circ}\text{C}$,其余同上;1.5%琼脂凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果、拍照。

表 1 ALV-J、MDV 和 REV 特异性鉴定引物序列

Table 1 Primers of ALV-J, MDV and REV for PCR identification

病毒 Virus	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	PCR 产物/bp Size of PCR product
ALV-J	A-Pf	GGATGAGGTGACTAAGA	545
	A-Pr	CGAACCAAAGGTAACACACG	
MDV	M-Pf	GCCTTTTATACACAAGAGCCGAG	560
	M-Pr	TTTATCGCGTTGTGGGTCATG	
REV	R-Pf	CATACTGGAGCCAATGGTT	300
	R-Pr	AATGTTGTAGCGAAGTACT	

1.3.4.5 *gp85*、*gp37*、3'UTR 和 3'LTR 基因克隆测序:根据 ALV-J 的英国原型株 HPRS-103 的全基因组碱基序列设计引物,上游引物 Pf: 5'-GT-CAGGGAATCGACGGTC-3',下游引物 Pr: 5'-GGACATCACCCAAAAGGATGA-3',目的基因包含 *gp85* 基因、*gp37* 基因、3'UTR 和 3'LTR 基因序列,目的片段大小预计 2 412 bp。以 1.3.4.4 提取的 DNA 为模板,PCR 反应采取 25 μL 体系,反应体系与反应条件同 ALV-J 的鉴定反应。1.5%琼脂凝胶电泳,凝胶成像系统观察结果、拍照。

用胶回收试剂盒回收目的片段,具体操作步骤参照胶回收试剂盒说明书;将目的片段连接到 Ptz57R/T 载体,操作步骤见 PCR 克隆试剂盒说明书;连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞内,培养过夜,挑单菌落摇菌,进行菌液 PCR 筛选阳性菌落,最后将阳性菌送往北京华大基因生物工程有限公司测序。

1.3.4.6 *gp85* 基因序列比较分析:用 DNASTar 软件对测序结果进行拼接,将各分离株的 *gp85* 基因序列与 GenBank 网站中已经公布的国内外原型株或标准株进行序列比对和遗传进化树分析。

2 结果

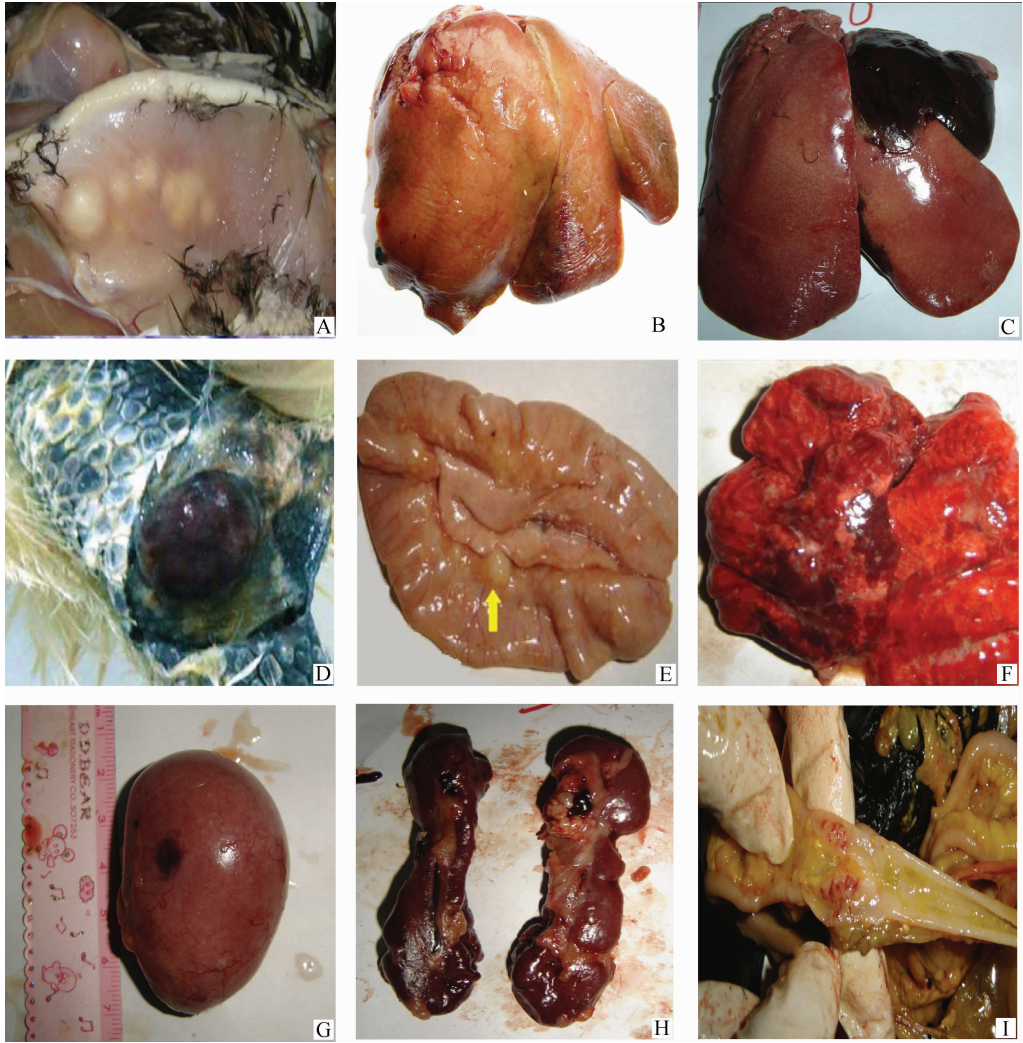
2.1 病理学检测

2.1.1 大体剖检病变 送检病鸡表现为消瘦、精神萎靡、嗜睡。1 号麻鸡胸肌出现纤维肉瘤(图

1A)、肝肿大,表面有坏死灶,质地易碎(图 1B);2 号乌鸡肝肿大、胆汁渗出(图 1C),腿部形成动脉血管瘤(图 1D),肠管萎缩液化,胰出现黄豆大小的肿瘤(图 1E);3 号麻鸡肺实变、出血,有黏液(图 1F),脾肿大,表面有针尖大小出血点(图 1G),肾肿大,出血(图 1H),盲肠扁桃体出血、有黏液渗出(图 1I)。

2.1.2 组织学病变 1 号麻鸡胸肌上的纤维肉瘤,肿瘤呈破坏性生长,与正常组织界限清楚,纤维排列紊乱,肿瘤细胞形态不一,细胞核异型性明显(图 2A);2 号乌鸡肝内的髓细胞瘤,髓细胞呈弥漫性或局灶性分布,呈圆形、体积较大,细胞核多呈空泡状、偏于一侧、呈圆形、椭圆形或肾形,胞质内含有数目较多的圆形嗜伊红颗粒(图 2B);2 号麻鸡腿部动脉血管瘤,动脉血管壁内有许多小动脉增生,血管内充血(图 2C);3 号麻鸡肺中典型的海绵状血管瘤,成红细胞瘤表现为大量的未成熟的红细胞聚集增生,成红细胞呈圆形、核质比例较大、细胞核呈圆形,染色较深(图 2D);3 号麻鸡肾出血,大量淋巴细胞增生,肾小管萎缩(图 2E);2 号乌鸡肠管及胰腺间形成髓细胞瘤及血管瘤,2 种瘤混合存在,附着于肠管浆膜面,向胰腺内延伸,胰腺被分割成不同大小的小叶(图 2F)。

2.1.3 血涂片观察 髓细胞白血病的血涂片视野中,有大量的髓细胞样瘤细胞,细胞核呈圆形、肾形或椭圆形,胞质内有大量嗜伊红颗粒(图 3A);淋巴细胞白血病的血涂片在视野中有大量的淋巴细



A. 鸡胸肌出现纤维肉瘤; B. 肝肿大, 表面有坏死灶, 质地易碎; C. 肝肿大、胆汁渗出; D. 腿部形成动脉血管瘤; E. 肠管萎缩液化, 胰出现黄豆大小的肿瘤; F. 肺实变、出血, 有黏液; G. 脾肿大, 表面有针尖大小出血点; H. 肾肿大、出血; I. 盲肠扁桃体出血、有黏液渗出

A. Fibrosarcoma in breast; B. Enlargement of the liver, necrosis in the surface, texture friable; C. Enlargement of the liver, bile leakage; D. Artery aneurysm in the leg; E. Atrophy and liquefaction of intestinal, pancreas appears tumor with the size of soybean; F. Consolidation and bleeding of lung, mucus leakage; G. Enlarged and bleeding of spleen, hemorrhagic spot in surface; H. Enlargement and bleeding of kidney; I. Bleeding of caecum tonsil, mucus leakage

图 1 送检病鸡的大体剖检病变

Fig. 1 General autopsy lesions of the sick chickens

胞, 细胞形态大小比较一致(图 3B); 成红细胞白血病的血涂片视野中有大量的未成熟的成红细胞, 细胞和细胞核类似于圆形, 细胞核染色较淡(图 3C)。

2.2 ALV-J 抗体检测

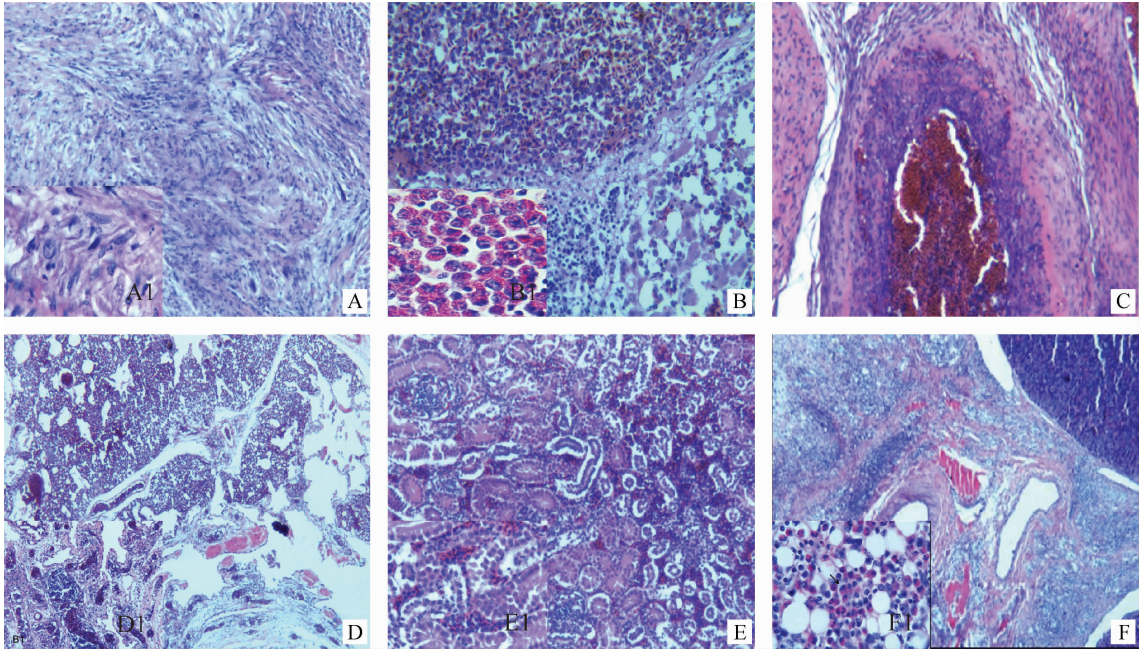
参照 Avian Leukosis Virus Antibody Test Kit (美国 IDEXX 公司)说明书, 检测 6 例送检病鸡的血清, 抗体检测结果均呈阳性。

2.3 ALV-J 的分离与鉴定

2.3.1 p27 抗原及 PCR 检测 将活鸡剖检, 取病料研磨、无菌处理后接到 DF-1 细胞, 维持至少 7

d, 用 Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit 检测 p27 抗原, 结果在活鸡样本中, 抗原检测呈阳性。通过 ALV-J、MDV 和 REV 特异性引物进行 PCR 鉴定和排除试验, 结果显示送检鸡为 ALV-J 感染, 电泳检测结果如图 4。

2.3.2 *env*、3'UTR 和 3'LTR 基因的扩增 提 p27 抗原检测为阳性的细胞 DNA, 通过 PCR 扩增包含 *gp85*、*gp37*、3'UTR 和 3'LTR 基因序列的目的片段, 电泳检测、拍照, 结果如图 5。

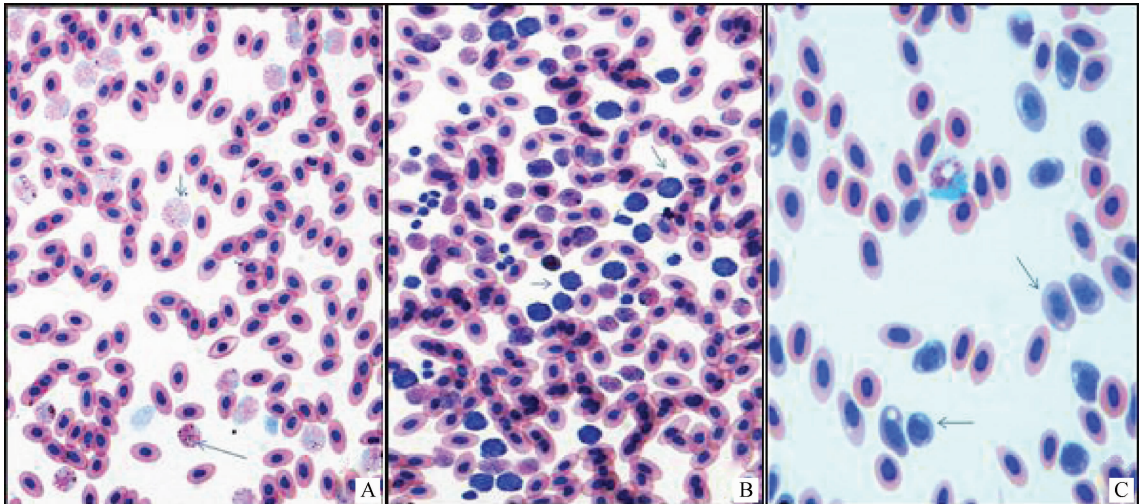


A. 胸肌的纤维肉瘤(100×)、A1(400×);B. 肝内的髓细胞瘤(100×)、B1(400×);C. 腿部动脉血管瘤(100×);D. 肝中的成红细胞瘤(100×)、D1(400×);E. 肾出血、淋巴细胞增生(100×)、E1(400×);F. 肠管及胰腺间的髓细胞瘤及血管瘤(100×)、F1(400×)

A. Fibrosarcoma in the pectorales (100×), A1 (400×); B. Medulloblastoma in liver (100×), B1(400×); C. Arterial aneurysm in the leg of silkie; D. Erythroblastoma in the liver (100×), D1 (400×); E. Renal hemorrhage and lymphocyte proliferation (100×), E1 (400×); F. Myelocytoma and angioma between the intestinal canal and pancreas (100×), F1 (400×)

图2 送检病鸡组织学病变

Fig. 2 Histopathological lesions of sick chickens



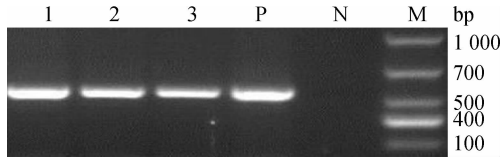
A. 髓细胞瘤型细胞;B. 淋巴细胞瘤型细胞;C. 成红细胞瘤型细胞
A. Myelocytomas cells;B. Lymphocytomas cells;C. Cholangiocarcinoma cells

图3 典型病例的血涂片观察

Fig. 3 Blood smear observation of typical cases

2.3.3 ALV-J 分离株 *env*、3'UTR 和 3'LTR 基因碱基序列分析 运用 DNASTar 软件和 Blast 网站对测序结果进行分析,结果显示这 3 株病毒为 ALV-J,将这 3 株毒株分别命名为 SDZB1、SDZB2

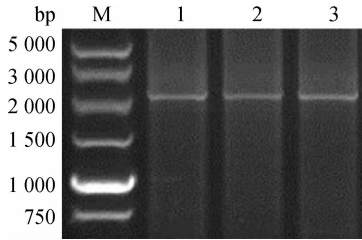
和 SDZB3。将这 3 株 ALV-J 分离株的 *env*/3'UTR/3'LTR 基因的碱基序列与 GenBank 网站上提交的标准株和参考株进行同源性及遗传进化分析。分离到的 3 株病毒与 ALV-J 原型株 HPRS-



1~3. 1号乌鸡、2号麻鸡、3号麻鸡的ALV-J; P. 阳性对照; N. 阴性对照; M. DNA相对分子质量标准
1-3. ALV-J isolated from chicken No. 1, 2 and 3, respectively;
P. Positive control; N. Negative control; M. DNA marker

图4 ALV-J分离株PCR产物

Fig. 4 Electrophoresis results of PCR product



M. DNA相对分子质量标准; 1~3. 1号乌鸡、2号麻鸡、3号麻鸡的ALV-J
M. DNA marker; 1-3. ALV-J isolated from chicken No. 1, 2 and 3, respectively

图5 病毒分离株 *env*、3'UTR、3'LTR 基因 PCR 扩增产物

Fig. 5 Electrophoresis results of PCR product

103的相似性相对较高,分别为93.5%、93.4%和89.8%,与美国分离株ADOL-7501的相似性相对较低,分别为90.7%、90.8%和85.9%,与国内其他ALV-J的分离株的相似性在84.6%~96.7%。分离自乌鸡的SDZB2毒株与分离自麻鸡的2株毒株SDZB1、SDZB3,基因相似性分别为95.1%、94.6%,即使是分离自同一品种鸡的SDZB1毒株与SDZB3毒株,其相似性也仅为94.1%(运用高保真DNA测序酶,可以忽略测序误差),显示3株病毒之间也形成较强的变异。遗传变异分析结果表明,SDZB1、SDZB2、SDZB3在一个独立的分支上,具有较强的变异性和相对独立的遗传地位。3株病毒都由分离自蛋鸡的HPRS-103毒株进化而来,却与分离自蛋鸡的各个毒株的同源性较近(图6),说明病毒在不断进化的过程中,在不同宿主选择压的作用下,发生了较强的变异。

2.3.4 Gp85蛋白氨基酸序列同源性及系统进化树分析 用DNASTAR软件对3株ALV-J分离株的Gp85蛋白氨基酸序列进行比对分析,结果如图7。由图7可知,3株ALV-J分离株及标准株的gp85基因都存在基因变异,变异的区域主要集中在45—68位、hr1、hr2和vr3区域,而vr2区相对保守。

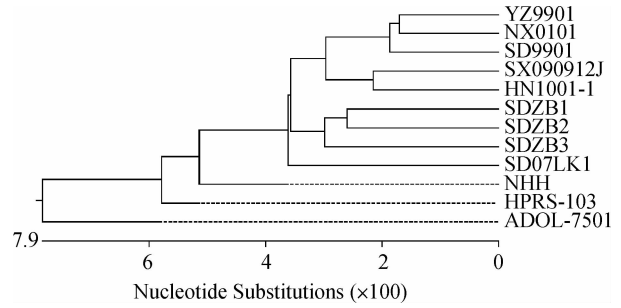


图6 ALV-J分离株 *env*、3'UTR、3'LTR 基因核苷酸碱基序列遗传进化分析结果

Fig. 6 Results of phylogenetic analysis of *env*, 3'UTR and 3'LTR genes

SDZB1、SDZB2、SDZB3株在第63和115位上有1个氨基酸缺失;SDZB2株在第214—217位上有4个氨基酸的缺失,这些缺失性突变在GenBank网站上公布的ALV-J标准毒株或参考毒株中都非常少见,SDZB2株病毒的Gp85蛋白仅剩302个氨基酸这种现象更是少见。3株ALV-J分离株和其它国内外标准株中,Gp85蛋白的第243—269区段和273—288区段的氨基酸相对保守,未发现缺失、插入和替换等基因变异情况。对分离到的3株ALV-J毒株和国内外标准毒株或参考毒株共12株毒株的Gp85蛋白氨基酸序列进行同源性分析和遗传进化分析,结果如图8、图9,由图可知:分离到的3株病毒与ALV-J原型株HPRS-103和美国分离株ADOL-7501的相似性都较低,分别为88.2%、89.1%和85.9%及85.9%、84.4%和82.3%,与国内其他ALV-J的分离株的相似性在82.3%~91.1%。SDZB2和SDZB3毒株与蛋鸡分离株NHH单独处在一个分支上,相似性分别为92.7%、88.9%。

3 讨论

J亚群禽白血病的频发,引起产蛋性能和生产性能的下降,给养禽业带来巨大的经济损失,而且到目前为止该病无疫苗、无特效药,给防治带来很大的困难。ALV-J在蛋鸡中主要引起髓细胞瘤、血管瘤和淋巴细胞瘤病变,随着ALV-J在各鸡群中的流行与进化,其致病性产生新的变化,除产生单一的髓细胞瘤,还会并发其它瘤型,如淋巴细胞瘤、纤维肉瘤、成髓细胞瘤、海绵状血管瘤等^[17-18],显示ALV-J致瘤型的多样化、复杂化,且易混合感染,发病日龄不断提前,发病率、死亡率不断上升。这引起国内外禽病界的高度重视,仅近两年禽病相关的国内刊物和SCI刊物上有多篇论文和报道发表^[19-24]。

```

SDZB1.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 79
SDZB3.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 79
SDZB2.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 79
HPRS-103.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
ADOL-7501.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
NHH.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 79
NX0101.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
SD07LK1.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
HN1001-1.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
SD9901.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
SX090912J.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80
YZ9901.pro  GVHLLQPGNVVWVWANKTGQTD FCLSLQSATSPFRICLIGIPQYPLNTFEGYVTNVIACDNNIDLASQTACLIALNTT 80

```

```

vr2 hr1
SDZB1.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN GSTVCHI FDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 158
SDZB3.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN GSTVCHI FDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 158
SDZB2.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN GSTVCHI FDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 158
HPRS-103.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
ADOL-7501.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN GSTVCHI FDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 159
NHH.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN GSTVCHI FDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 158
NX0101.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
SD07LK1.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKNN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
HN1001-1.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
SD9901.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
SX090912J.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 160
YZ9901.pro  LPWDPELDILGSMIKNGTTRTCVTFG SVCYKENN SRVCHFDGNFNGTGGAAEALRDFIAKWKSDDLIRPYVNGSW 159

```

```

hr2 vr3
SDZB1.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA YSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 235
SDZB3.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA YSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 235
SDZB2.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 231
HPRS-103.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 237
ADOL-7501.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA YSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 236
NHH.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 231
NX0101.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 237
SD07LK1.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 237
HN1001-1.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 240
SD9901.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 237
SX090912J.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 237
YZ9901.pro  TMVSPINTESFSSIRYCGFTSNETRYR YG---NLSDWCSKGGWSA GYSNGTCCSNTT GCGNCTAEWNYAYGFTF 239

```

```

vr3
SDZB1.pro  GQPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 306
SDZB3.pro  GQPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 306
SDZB2.pro  GNPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 302
HPRS-103.pro  GQPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 308
ADOL-7501.pro  GQPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 307
NHH.pro  GNPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 302
NX0101.pro  GEPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 308
SD07LK1.pro  GNPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 308
HN1001-1.pro  GNPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 311
SD9901.pro  GEPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 308
SX090912J.pro  GQPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 308
YZ9901.pro  GNPEVLWNGTAKALPPGIFLICGDR AWQGI PRNALGGPCYLQGLTMLS FNFTTWMTY GPNITGHRRSRR 310

```

图 7 ALV-J 分离株 Gp85 蛋白氨基酸序列分析

Fig. 7 Sequence analysis of Gp85 of ALV-J isolated strains

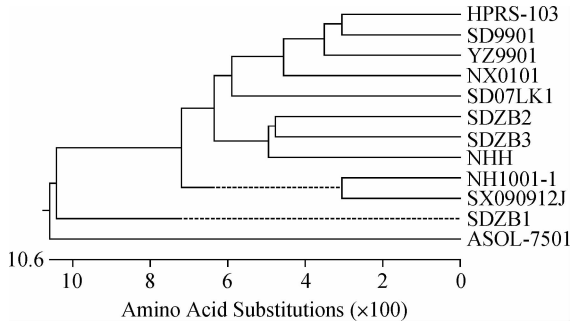


图 8 ALV-J 分离株 Gp85 蛋白氨基酸序列遗传进化分析
Fig. 8 Phylogenetic analysis of Gp85 protein of ALV-J isolates

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence	1	■	89.2	88.6	88.7	87.6	92.2	82.1	91.5	89.9	89.0	94.5	90.9	1	YZ9901
	2	11.7	■	89.9	92.7	88.9	88.6	83.0	88.2	88.9	89.2	90.8	89.8	2	NHH
	3	12.4	10.9	■	90.1	87.3	88.2	85.9	86.3	87.3	87.9	89.5	89.5	3	SDZB1
	4	12.2	7.7	10.7	■	91.1	89.1	84.4	88.4	91.1	90.7	90.7	89.4	4	SDZB2
	5	13.6	12.1	14.0	9.5	■	85.9	82.3	84.6	86.9	88.9	86.9	88.9	5	SDZB3
	6	8.3	12.4	12.8	11.8	15.6	■	84.0	90.3	89.0	91.6	94.2	92.2	6	HPRS-103
	7	20.5	19.4	15.7	17.6	20.3	18.1	■	81.0	82.7	86.0	84.0	86.6	7	ADOL-7501
	8	9.0	12.8	15.2	12.6	17.2	10.5	21.9	■	89.3	87.3	92.5	87.9	8	NX0101
	9	10.9	12.1	14.0	9.5	14.4	12.0	19.7	11.6	■	89.9	89.6	87.9	9	SD07LK1
	10	11.9	11.7	13.2	9.9	12.1	9.0	15.5	13.9	10.8	■	89.6	94.2	10	HN1001-1
	11	5.8	9.8	11.3	9.9	14.4	6.1	18.1	7.9	11.2	11.2	■	90.9	11	SD9901
	12	9.7	10.9	11.3	11.5	12.1	8.3	14.7	13.2	13.2	6.1	9.7	■	12	SX090912J
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			

图 9 ALV-J 分离株 Gp85 蛋白氨基酸序列相似性分析
Fig. 9 Homology analysis of Gp85 protein of ALV-J isolates

原表位,使中和抗体无法识别,从而逃避免疫攻击。除此以外,病毒还会通过变异来形成或失去某些顺式或反式作用位点来改变囊膜蛋白的功能性和自身的复制能力,笔者从送检的 360 日龄鸡体内分离到 SDZB1、SDZB2、SDZB3 这 3 株病毒,并且 ALV-J 抗体检测为阳性,即为 V+A+ 状态,说明病毒发生了明显的突变,因此机体内抗体不能中和病毒,而呈共存状态。通过对这 3 株病毒的 gp85 基因碱基序列比对和遗传进化分析发现,这 3 株病毒的 gp85 基因发生了插入、替换和缺失形式的变异,而且在遗传进化上 gp85 基因处在一个单独的分支上,形成相对独立的遗传地位。以此推断,这 3 株病毒能够发生新的特征性变异,可能是因为病毒在宿主体内长期存在,长期与宿主免疫攻击做斗争,在宿主免疫选择压长期作用下形成的。

不同品种鸡的混养,ALV-J 在不同品种鸡间水平传播,在不同宿主选择压的作用下可能会促进病

淋巴细胞瘤病、成红细胞瘤病和髓细胞瘤病的瘤细胞都是通过血液运输由原发部位转移进入肝、脾等器官,所以在血液中存在大量相应的瘤细胞。通过观察送检病例的静脉血涂片,确实发现在血涂片中出现与肿瘤病相对应的瘤细胞大量存在,因此,可以根据血涂片中血细胞的形态和数量的变化作为今后临床诊断肿瘤病的初步依据。

结合实验室抗体检测和病毒分离发现,在临床病例中有机体呈现抗体阳性、病毒阳性的状态。在宿主长期免疫选择压作用下,病毒通过变异改变抗

毒基因的变异。当 ALV-J 先感染某一种品种的鸡后,病毒会通过变异改变抗原表位或改变囊膜蛋白的功能性和自身的复制能力逃避免疫攻击。由于不同品种鸡的混养,当变异的病毒感染另一品种的鸡时,其致病性可能会更强,从而激发不同肿瘤型的出现,而且在另一品种的免疫选择压作用下,病毒基因的变异性会更强。因此,为了防止病毒基因的不断变异和致病性的增强,不同品种的鸡群不适宜混合饲养。

4 结论

送检病鸡肝、肾肿大,胸肌出现纤维肉瘤,肠管萎缩液化,胰出现黄豆大小的肿瘤结节;乌鸡肝出现髓细胞瘤,腿部形成动脉血管瘤,肠管及胰腺间出现髓细胞瘤及血管瘤等,麻鸡肝出现成红细胞瘤,肺出现海绵状血管瘤。血液出现髓细胞样瘤细胞,中性粒细胞的数量和比例明显升高。病鸡 ALV p27 抗

原和抗体检测均为阳性,PCR 鉴定为 ALV-J 感染。分别从乌鸡和麻鸡中分离出 1 株和 2 株病毒,序列分析显示病毒基因变异性较大。

参考文献:

- [1] 赵振华,杨钰莹,成子强. 禽白血病[M]. 北京:中国农业出版社,2006.
- [2] BAI J, HOWES K, PAYNE L N, et al. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J) [J]. *J Gen Virol*, 1995, 76 (Pt 1):181-187.
- [3] CHESTERS P M, HOWES K, PETHERBRIDGE L, et al. The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by avian leukosis virus subgroups A and J respectively [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 10):2553-2561.
- [4] ZHOU G, CAI W, LIU X, et al. A duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection and quantitation of avian leukosis virus subgroups A and B [J]. *J Virol Methods*, 2011, 173(2): 275-279.
- [5] PAYNE L N, BROWN S R, BUMSTEAD N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(Pt4):801-807.
- [6] PAYNE L N. Retrovirus-induced disease in poultry [J]. *Poult Sci*, 1998, 77(8):1204-1212.
- [7] GOODWIN M A, HAFNER S, BOUNOUS D L, et al. Myeloid leukosis, is a misnomer; multiple and diverse tumor morphotypes are found in broiler bleeder that are infected with J-ALV [C]. Proceedings of the 135th American Veterinary Medicine Association annual convention. Baltimore: American Veterinary Medicine Association, 1998, 183.
- [8] 杜岩, 崔治中, 秦爱建, 等. 鸡的 J 亚群白血病病毒的分离及部分序列比较 [J]. *病毒学报*, 2000, 16(4): 341-346.
- [9] CUI Z Z, DU Y, ZHANG Z, et al. Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains [J]. *Avian Dis*, 2003, 47(4):1321-1330.
- [10] 张志, 崔治中, 赵宏坤. 我国 2000-2001 年 J 亚群禽白血病病毒分离株 gp85 基因的序列比较 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(1):25-27.
- [11] 杜岩, 崔治中, 秦爱建, 等. 从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒 [J]. *中国家禽报*, 1999, 3(1):1-4.
- [12] XU B, DONG W, YU C, et al. Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33(1):7-13.
- [13] 徐镛蕊, 董卫星, 余春明, 等. 用 ALV-Jgp85 单克隆抗体证明蛋鸡存在 J 亚群禽白血病 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(3):269-271.
- [14] 王辉, 崔治中. 蛋鸡 J 亚群白血病病毒的分离鉴定与序列分析 [J]. *病毒学报*, 2008, 24(5):369-375.
- [15] 成子强, 张利, 刘思当, 等. 中国麻鸡中发现禽 J 亚群白血病 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(4):584-587.
- [16] SUN S H, CUI Z Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukosis virus infectious in chinese local "yellow" chicken [J]. *Avian Pathol*, 2007, 36(3):221-226.
- [17] 孙淑红, 柴家前, 王波, 等. 表现腺胃炎的蛋用型鸡 J 亚群白血病病毒的分离与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(2):251-254.
- [18] 代阳, 杨其峰, 王波, 等. 不同地区海兰褐蛋鸡中 J 亚群白血病病毒株 gp85 基因的分子演化分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(5):635-638.
- [19] LIU C, ZHENG S, WANG Y, et al. Detection and molecular characterization of recombinant avian leukosis viruses in commercial egg-type chickens in China [J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(3):269-275.
- [20] ZHANG H, LAI H, QIA Y, et al. An ALV-J isolate is responsible for spontaneous haemangiomas in layer chickens in China [J]. *Avian Pathol*, 2010, 40(3): 261-267.
- [21] LAI H, ZHANG H, NING Z, et al. Isolation and characterization of emerging subgroup J avian leukosis virus associated with hemangioma in egg-type chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151(3-4):275-283.
- [22] SHI M, TIAN M, LIU C, et al. Sequence analysis for the complete proviral genome of subgroup J Avian Leukosis virus associated with hemangioma; a special 11 bp deletion was observed in U3 region of 3'UTR [J]. *Virol J*, 2011, 8:158. doi:10.1186/1743-422X-8-158.
- [23] GAO Y, QIN L, WEI P, et al. Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(10):1637-1638.
- [24] SUN H, QIN M, XIAO Y, et al. Haemangiomas, leiomyo-sarcoma and myeloma caused by subgroup J avian leukosis virus in a commercial layer flock [J]. *Acta Vet Hung*, 2010, 58(4):441-451.