

# 河南商品蛋鸡群中鸡马立克氏病的流行病学研究

禹乐乐<sup>1,2</sup> 滕 蔓<sup>1</sup> 罗 俊<sup>1</sup> 王新卫<sup>3</sup> 宿靖伟<sup>1,3</sup> 柴书军<sup>1</sup> 王爱萍<sup>2</sup> 张改平<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室 河南省动物免疫学重点实验室 河南 郑州 450002;

2. 郑州大学 生物工程系 河南 郑州 450001; 3. 河南农业大学 牧医工程学院 河南 郑州 450002)

**摘要:**2011-2012年,河南省大面积暴发商品蛋鸡群肿瘤病,临床剖检疑似马立克氏病(Marek's disease, MD),为进一步确诊病因,根据马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)的*meq-gB*和*pp38*基因分别设计了3对特异性引物,利用PCR技术对送检的疑似病例鸡的肝脏和脾脏样品分别进行了检测和分析。结果显示,各地区随机抽取的5只病例鸡肝脏、脾脏样品中均扩增出3种不同大小的MDV特异性病毒基因PCR产物,这表明MDV在河南鸡群中广泛流行,并导致了商品蛋鸡群MD的暴发。研究结果填补了河南省MD流行病学空白,为今后MD的临床快速诊断及有效防控提供了重要参考依据。

**关键词:**马立克氏病; 流行病学; 马立克氏病病毒; 聚合酶链式反应

中图分类号:S831.7 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)06-0163-04

## Epidemiology of Marek's Disease in Commercial Layer Chickens in Henan Province

YU Le-le<sup>1,2</sup> ,TENG Man<sup>1</sup> ,LUO Jun<sup>1</sup> ,WANG Xin-wei<sup>3</sup> ,SU Jing-wei<sup>1,3</sup> ,  
CHAI Shu-jun<sup>1</sup> ,WANG Ai-ping<sup>2</sup> ,ZHANG Gai-ping<sup>1</sup>

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology ,Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture ,Henan Academy of Agricultural Sciences ,Zhengzhou 450002 ,China; 2. Department of Bioengineering ,Zhengzhou University ,Zhengzhou 450001 ,China; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine ,Henan Agricultural University ,Zhengzhou 450002 ,China)

**Abstract:** In 2011-2012, the tumorigenic and immunosuppressive disease were broken out in the commercial layer chickens in large areas of Henan province. The clinical symptoms and macroscopic pathological inspections suggested that it might be a case of Marek's disease (MD). In order to identify the cause of the disease, three pairs of primers specific to the MDV *meq-gB* and *pp38* genes were designed according to the genomic sequence of MDV strain GA. Meanwhile, polymerase chain reaction (PCR) was carried out on liver and spleen samples of those suspected cases. The results showed that three different sizes of PCR products of MDV-specific genes were successfully amplified from the randomly tested five cases collected in each region. It indicated that MDV was widely spread in Henan Province and led to the outbreak of MD in the commercial layer chickens. The study provided useful information for the rapid diagnosis and efficient control of MD in the future.

**Key words:** Marek's disease; Epidemiology; MDV; PCR

鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)是由马立克氏病毒(Marek's disease virus, MDV)引起的一种急性淋巴组织增生性肿瘤病,是严重危害世界家禽养殖业最重要的免疫抑制病与肿瘤病之一,可经空气传播,具有高度传染性<sup>[1]</sup>。MDV有3个血清型<sup>[2]</sup>,其中血清I型(MDV-I)感染后在造成感染鸡免疫抑制的同时,还可导致肿瘤的发生<sup>[3]</sup>。MD

首次报道于1907年<sup>[4]</sup>,此后在全球范围内发现了该病的广泛流行<sup>[5]</sup>。近年来,我国多个省份不断有该病群发的相关报道,给养鸡业造成了严重的经济损失<sup>[6-8]</sup>。MD是世界上第一个可以用病毒疫苗直接进行免疫预防的肿瘤病<sup>[9]</sup>。目前,使用的MDV进口苗与国产苗有多种,如血清I型的CVI988/Rispens株和814株、血清II型的SB-1株和Z4株以

收稿日期:2012-08-08

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31072145); NSFC-广东联合基金重点项目(U1131005); 有害生物控制与资源利用国家重点实验室开放课题资助项目(SKLBC2011K02)

作者简介:禹乐乐(1987-),男,河南平顶山人,在读硕士,主要从事病毒分子生物学与免疫学研究。

通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,中国工程院院士,主要从事动物免疫学及重大疫病快速检测技术研究。

及血清Ⅲ型的 FC126 株,其中,前 2 种在国内应用最广,并为我国 MD 的有效防控发挥了重要作用<sup>[10]</sup>。但是,随着疫苗免疫压力选择和病毒自身进化,MDV 的毒力已大大增强,部分毒株已经突破了现有疫苗的免疫保护<sup>[11]</sup>。2011–2012 年,河南省大面积暴发个体养鸡户商品蛋鸡群肿瘤病,临床剖检疑似 MD,为进一步确诊病因,本研究根据 MDV 的 *meq*、*gB* 和 *pp38* 基因分别设计了 3 对特异性引物,对送检疑似病例鸡的肝脏和脾脏样品分别进行了 PCR 分析,旨在为今后河南省鸡群 MD 的防控提供参考信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MD 疑似发病或病死鸡分别采集自河南省漯河市、光山县、栾川县、新郑市、上蔡县和林州市 6 个地区 20 余个个体养殖户,各地区随机取同批发病的 5 只鸡进行剖检,分别采集肝脏、脾脏样品,编号依次为 HNLH-1 ~ HNLH-5, HNCS-1 ~ HNCS-5, HNLC-1 ~ HNLC-5, HNXZ-1 ~ HNXZ-5, HNCS-1 ~ HNCS-5 和 HNLZ-1 ~ HNLZ-5, -20℃ 条件下保存备用。

### 1.2 试剂

Ex Taq 酶试剂盒、Universal Genomic DNA Extraction Kit 均购自 TaKaRa 公司,其他均为常规化学试剂。

### 1.3 引物设计

根据 MDV 国际标准强毒株 GA 的基因组序列 (GenBank Acc. No. AF147806),用 Premier Primer 5.0 软件分别设计了针对 *meq*、*gB* 和 *pp38* 基因的 3 个特异性引物对,均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.4 组织样本 DNA 的提取

各取 1 g 病例鸡的肝脏或脾脏组织样品,置于 1.5 mL 无菌离心管,同时各加入 100  $\mu$ L Solution A (DNA Extraction Kit, TaKaRa) 及 5 ~ 10 粒钢珠,置入 Bullet Blender 组织细胞破碎仪 (Next Advance 公司,美国) 中,设定转速为 10 档、定时破碎 5 min,然后取出离心管,1 000 g 离心 1 min 后,转移上层组织匀浆各 100 ~ 200  $\mu$ L 至新离心管中,然后按 DNA Extraction Kit 说明书提取组织总 DNA,最后各用 100  $\mu$ L  $d_3H_2O$  回溶总 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, -20℃ 冰箱中冻存备用。

### 1.5 PCR 方法建立及条件优化

以 HNLH-1 ~ HNLH-5 和 HNCS-1 ~ HNCS-5 的脾脏组织总 DNA 为模板,用 PCR 扩增 MDV *meq* 基因片段,摸索 *meq* 引物对的最佳退火温度。20  $\mu$ L

PCR 体系包括: Ex Taq 酶 10  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L 的上下游引物各 1  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L 的 DNA 模板 1  $\mu$ L,  $d_3H_2O$  7  $\mu$ L。PCR 条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 复性温度分别为 50、55、60℃, 复性 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 返回第 2 步循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 10 min。各取 4  $\mu$ L PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。*gB*、*meq* 引物对最佳复性温度的确定方法同上。

### 1.6 MD 疑似病例鸡的 PCR 分析

根据方法 1.4 和 1.5 确定的最佳条件,对 1.1 中描述的全部疑似病例鸡的脾脏样品进行 PCR 分析,分别扩增 MDV 的 *meq*、*gB* 和 *pp38* 基因片段。PCR 使用 20  $\mu$ L 体系,包括 Ex Taq 酶 10  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L 的上下游引物各 1  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L 的 DNA 模板 1  $\mu$ L,  $d_3H_2O$  7  $\mu$ L。PCR 条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, *meq*、*gB* 和 *pp38* 这 3 个基因的复性温度分别为 60、49、50℃, 复性 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 返回第 2 步循环 30 次; 最后 72℃ 延伸 10 min。各取 4  $\mu$ L PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 MD 疑似病例鸡的临床症状及剖检病变

本次调查涉及的 MD 疑似病例鸡最初发病日龄约为 50 ~ 60 d, 病鸡表现呆立、缩颈、羽毛蓬松、拉黄色稀便、大部分鸡极其消瘦、个别鸡伴随神经症状。至 120 日龄左右,发病率和死亡率达到高峰,150 日龄左右时大部分地区鸡场的死淘率为 15% ~ 30%, 而栾川县周边鸡场则高达 95% 左右 (表 1)。剖检观察病例鸡,发现大部分病死鸡呈现以肝脏、脾脏肿大为主的多种或单一实质性器官的弥散性肿瘤或局灶性肿瘤,部分极其消瘦并最终死亡的病例鸡肝脾未见明显肿大或眼观可见的肿瘤结节。

### 2.2 MD 疑似病例鸡肝、脾组织总 DNA 电泳分析结果

对随机挑选的 30 个疑似病例鸡的肝脏和脾脏组织总 DNA 分别进行了提取并测定了 DNA 质量。为分析提取的总 DNA 质量,以 HNLH-4 号样本为例进行了电泳分析。测定结果显示, HNLH-4 的肝、脾组织 DNA 质量浓度分别为 1 132.3  $\mu$ g/L、647.8 ng/ $\mu$ L, 分别以 1:10<sup>1</sup>、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup> 梯度稀释后,各取 2  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示,1:10<sup>1</sup> 稀释的样品中组织总 DNA 均清晰可见,其 DNA 总量为 200 ~ 300 ng; 1:10<sup>2</sup> 稀释的样品中组织总 DNA 仅隐约可见; 1:10<sup>3</sup> 稀释的样品中未能见到组织总 DNA (图 1)。上述结果表明,提取的肝脏及脾脏组织总 DNA 质量均较好。

表 1 MD 疑似病例样本采集信息

Tab.1 Information of the clinical samples collected from the suspected MD cases						
序号 No.	样品编号 Samples	采集地点 Geographic location	采集时间 Collection time	品系 Species	发病日龄 Age of disease	死淘率 Mortality and rejection rate
1	HNGS	河南光山	2011-10-23	海兰褐蛋鸡	90 ~ 145	≤15%
2	HNLH	河南漯河	2011-10-24	海兰褐蛋鸡	90 ~ 120	10% ~ 15%
3	HNLC	河南栾川	2011-11-06	黄山土鸡	60 ~ 140	70% ~ 95%
4	HNXZ	河南新郑	2011-11-21	康达尔麻鸡	100 ~ 130	5% ~ 10%
5	HNSC	河南上蔡	2012-02-16	海兰褐蛋鸡	60 ~ 120	15% ~ 20%
6	HNLZ	河南林州	2012-03-06	地方麻鸡	100 ~ 160	≤35%

2.3 MDV *meq*、*pp38*、*gB* 基因的 PCR 条件优化

以 HNLH-1 ~ HNLH-5、HNGS-1 ~ HNGS-5 之病例鸡的肝脏总 DNA 为模板,常规 PCR 方法扩增 MDV 的 *meq* 基因并摸索其最佳复性温度(引物对详见表 2)。PCR 扩增产物的电泳结果表明,以不同的退火温度进行扩增,PCR 扩增产物的数量及长度具有明显差异。当退火温度由 50℃ 逐渐升至 60℃ 时,PCR 产物的特异性明显增加,每个样品均扩增出大小约 1 020 bp 的片段,与预期相符(图 2),说明扩增 *meq* 基因的最佳复性温度为 60℃。进一步的试验表明 *gB* 和 *pp38* 基因的最佳复性温度分别为 49, 50℃。

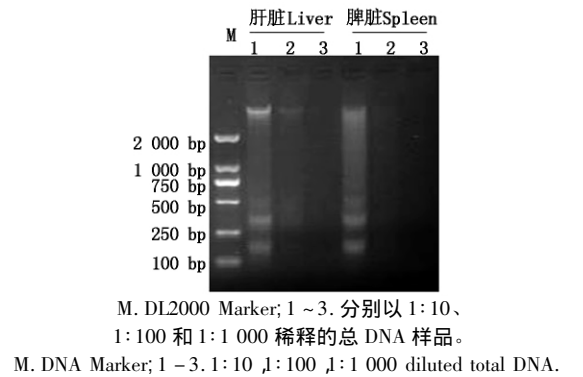


图 1 HNLH-4 号病例鸡肝、脾组织 DNA 电泳分析结果  
Fig.1 Electrophoretic analysis of the total hepatic and splenic DNA of chicken #HNLH-4

表 2 用于 MDV 基因扩增的引物及序列

Tab.2 Primers used for amplifying the MDV genes in this study					
引物对 Primer pair	引物名称 Primer name	长度/nt Length	基因组位点 Genomic location	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	PCR 产物/bp Amplicon
1	<i>meq</i> Forward	18	134867 ~ 134884	ATGTCTCAGGAGCCAGAG	1 020
	<i>meq</i> Reverse	18	135869 ~ 135886	TCAGGGTCTCCCCTCACC	
2	<i>gB</i> Forward	18	63635 ~ 63652	ATGCACTATTTTAGCGCG	2 296
	<i>gB</i> Reverse	18	61357 ~ 61374	GGGCTTTCATTGGATTGC	
3	<i>pp38</i> Forward	16	127817 ~ 127832	ACCGCACGCTTTGCTC	963
	<i>pp38</i> Reverse	18	126869 ~ 126887	TTAATCTCCGCCTCCAAC	

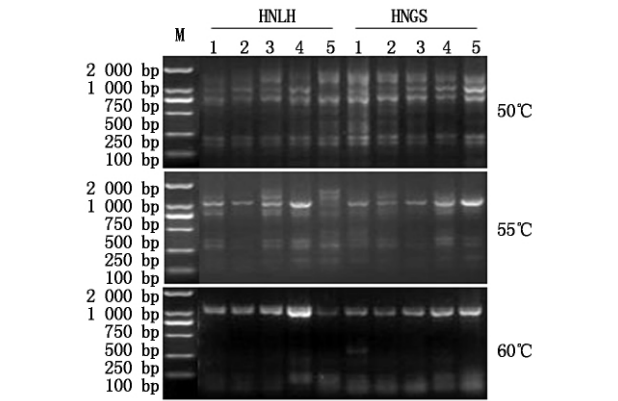


图 2 不同退火温度条件下 PCR 扩增 *meq* 基因产物的电泳分析  
MK. DNA Marker; 1 ~ 5. 随机挑选的 5 份不同病例鸡肝脏 DNA 样品。  
M. DNA Marker; 1 ~ 5. Five randomly selected hepatic DNA samples.

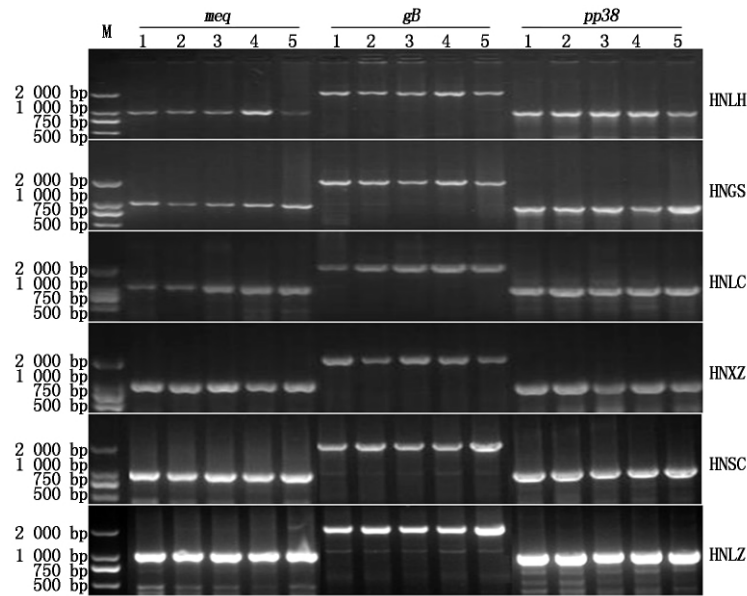
图 2 不同退火温度条件下 PCR 扩增 *meq* 基因产物的电泳分析  
Fig.2 Amplification of the *meq* gene from five randomly selected hepatic DNA using different PCR annealing temperatures

2.4 河南 6 个地区 MD 疑似病例鸡的 PCR 分析结果  
利用上述建立的条件,分别对 6 个地区随机挑选的 30 个病例鸡样品进行 PCR 扩增,用于 MDV

*meq*、*gB* 和 *pp38* 基因扩增的引物详见表 2。电泳分析结果表明,全部病例鸡的肝脏样品中均分别扩增出 3 个大小为 1 020、2 296、963 bp 的特异性 PCR 产物,大小与 MDV 的 *meq*、*gB*、*pp38* 这 3 个基因的预期产物完全相符(图 3),说明这些病例鸡均存在 MDV 感染。

3 讨论

本研究中调查分析的疑似 MD 病例在相对集中的时间段内发生在豫南、豫北、豫西以及豫中 6 个地市的 20 余个养鸡场,感染鸡群数量超过 10 万只,发病鸡的品系多样(如海兰褐、黄山土鸡、康达尔麻鸡及地方麻鸡等),发病及死亡高峰出现在开产前 120 ~ 150 日龄,大部分地区的死淘率为 15% ~ 30%,个别地区甚至高达 95% 左右,给当地蛋鸡养殖户造成巨大经济损失。发病鸡的临床症状及病死鸡剖检病变与典型的 MD 病例症状相符。对随机挑选的 30 个



M. DNA Marker; 1~5. 同一地区随机挑选的5个不同病例鸡的肝脏DNA样品。

M. DNA Marker; 1-5. Five randomly selected hepatic DNA samples of diseased chickens from each region.

图3 MD疑似病例鸡的PCR扩增结果

Fig.3 Amplification of the MDV genes from suspected MD cases

病例鸡样品进行PCR分析,发现这些病例鸡中均可以扩增出MDV的*meq*、*gB*、*pp38*这3个标志性基因的预期PCR产物,阳性率为100%,上述结果充分表明,MDV在河南鸡群中广泛流行并导致了商品蛋鸡群MD的暴发,同时也为发病鸡场的临床诊断、防控以及经济损失的追溯赔偿提供了重要参考依据。

根据对种鸡场免疫程序的追溯性调查,发现这些发病鸡群均已进行过MDV疫苗的免疫接种,这说明导致这些鸡群暴发MD的原因除疫苗质量、运输保存、免疫接种等环节导致免疫失败之外,还可能与MDV毒力增强有关<sup>[12]</sup>。此前研究表明,国内外均已报道了免疫鸡群暴发MD的现象<sup>[6,13-14]</sup>。1979年美国首次分离出MDV的超强毒株,1996年有学者又分离到特超强毒株,MDV流行毒株毒力的增强可能是导致免疫鸡群MD暴发的主要原因之一<sup>[15]</sup>。要确认本次MD暴发是不是流行毒株毒力增强并突破现有疫苗的保护,需要进行流行毒株的分离鉴定及进一步研究。目前,笔者已经获得10余个分离株,相关研究正在进行之中。此外,MDV与REV、ALV以及CIAV的共感染也可能是导致MD免疫失败的重要因素之一<sup>[16-17]</sup>。本次河南省大面积暴发MD的鸡群,尤其是部分死淘率极高的鸡群是否存在这些免疫抑制性病毒的共感染,仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Witter R L, Schat K. Marek's Disease [M]//Saif Y M. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press, 2003: 407-464.

- [3] Morimura T, Hattori M. Immunomodulation of peripheral T cells in chickens infected with Marek's disease virus: involvement in immunosuppression [J]. Journal of General Virology, 1995, 76(12): 2979-2985.
- [4] Marek J. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1907, 15: 417-421.
- [5] 邵洪泽, 孙强. 鸡马立克氏病的危害、流行病学特点及症状 [J]. 兽医导刊, 2010(6): 20-22.
- [6] Teng L, Ping W. Molecular epidemiological investigation of Marek's disease virus from Guangxi, China [J]. Archives of Virology, 2011, 156(2): 203-206.
- [7] 韦平. 马立克氏病研究的最新进展 [J]. 广西农业生物科学, 2000, 19(2): 110-115.
- [8] 王桂军, 韦平. 鸡三种肿瘤病在广西的流行病学研究 [J]. 中国家禽, 2002, 24(10): 13-15.
- [9] Okazaki W, Purchase H G, Burmester B. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys [J]. Avian Diseases, 1970, 14(2): 413-429.
- [10] 刘文惠, 胡毓骥, 曹春景, 等. 鸡马立克氏病免疫现状及其研究进展 [J]. 河南农业科学, 1992(2): 36-38.
- [11] Gimeno I M. Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow [J]. Vaccine, 2008, 26: 31-41.
- [12] 王克领. 鸡马立克氏病免疫失败的原因及对策 [J]. 河南农业科学, 1999(7): 32-34.
- [13] Woźniakowski G, Kozdrún W. Molecular characteristics of Polish field strains of Marek's disease herpesvirus isolated from vaccinated chickens [J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2011, 53(1): 10.
- [14] Tavlarides-Hontz P, Kumar P M, Amortegui J R et al. A deletion within glycoprotein L of Marek's disease virus (MDV) field isolates correlates with a decrease in bivalent MDV vaccine efficacy in contact-exposed chickens [J]. Avian Diseases, 2009, 53(2): 287-296.
- [15] Witter R L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates [J]. Avian Diseases, 1997, 41(1): 149-163.
- [16] 张洪海. 地方柴鸡中J亚群禽白血病与马立克氏病的混合感染 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(8): 1215-1221.
- [17] Miles A M, Reddy S M, Morgan R W. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype [J]. Avian Diseases, 2001, 45(1): 9-18.