

# ELISA 与 IFA 用于检测 J 亚型禽白血病病毒的比较分析

王鑫<sup>1</sup>, 崔治中<sup>2</sup>, 龚建森<sup>1</sup>, 高明燕<sup>1</sup>, 范建华<sup>1</sup>, 俞燕<sup>1</sup>, 朱静<sup>1</sup>, 徐步<sup>1\*</sup>

(1. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

**摘要:** 为比较 ELISA 与 IFA 用于检测 J 亚型禽白血病病毒上的差别, 将 5 个不同梯度 TCID<sub>50</sub> 的 NX0101 病毒接种到 DF-1 细胞上, 维持培养 6 个不同时间段(1、2、3、5、7 和 9 d), 比较 2 种方法检测结果的相关性。试验发现接种剂量高于 10<sup>1.625</sup> 个 TCID<sub>50</sub> 时, 维持培养 2~3 d IFA 即可检出阳性结果, 而 ELISA 检测 P27 抗原相对滞后 2~4 d; 当接种剂量低于 10<sup>0.625</sup> 个 TCID<sub>50</sub> 时, 维持培养至 7 d IFA 检测结果为阳性而 ELISA 检测仍为阴性。由此得出结论 IFA 能快速、准确地检测到病毒的感染, 而 ELISA 检出时间有明显滞后性。

**关键词:** J 亚群禽白血病病毒; 酶联免疫吸附试验; 间接免疫荧光试验

中图分类号: S854.43

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)09-1499-05

## Comparison of ELISA and IFA in the Detection of the J Subgroup Avian Leukosis Virus

WANG Xin<sup>1</sup>, CUI Zhi-zhong<sup>2</sup>, GONG Jian-sen<sup>1</sup>, GAO Ming-yan<sup>1</sup>, FAN Jian-hua<sup>1</sup>,  
YU Yan<sup>1</sup>, ZHU Jing<sup>1</sup>, XU Bu<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China; 2. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** For comparing ELISA and IFA in the detection of J subgroup avian leukosis virus, five different dilution of NX0101 TCID<sub>50</sub> virus were inoculated to DF1 cell and cultured. In six different stages (1, 2, 3, 5, 7 and 9 days culturation), ELISA was applied to detect P27 antigen within supernatant and IFA was conducted to detect the infected cells respectively. Using more than 10<sup>1.625</sup> TCID<sub>50</sub> of the inoculation dose, IFA achieves identification of all the infected cells at 2 days and 3 days post inoculation, but the results from ELISA is relatively lag of 2-4 days for confirmation. Inoculating less than 10<sup>1.625</sup> TCID<sub>50</sub> of virus, IFA detect successfully the infected cells while ELISA still not detect by 7th day. The results suggest that IFA is more accurate and effective than commercial ELISA kit, ELISA have obvious hysteresis in comparison to IFA.

**Key words:** subgroup J avian leukosis virus; ELISA; IFA

J 亚群禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 是一种外源性 ALV, 具有很强的致病性和传播能力。L. N. Payne 等于 20 世纪 80 年代末首次在肉种鸡中发现此病毒<sup>[1]</sup>, 此后在全世界范围内暴发, 给肉鸡业造成巨大损失<sup>[2,3]</sup>。中国于 1999 年首

次在肉鸡中分离到该病毒<sup>[4]</sup>, 2005 年海兰褐蛋鸡发现了 ALV-J 的感染<sup>[5]</sup>, 近年来部分地方鸡种也陆续有 ALV-J 病例的报道<sup>[6-7]</sup>。ALV-J 感染在中国鸡群中已相当普遍, 其临床表现也日趋复杂化和多样化。ALV-J 的诊断国内外常用酶联免疫吸附试验

收稿日期: 2013-03-22

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项( # 201203055)

作者简介: 王鑫(1984-), 女, 山东潍坊人, 研究实习员, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: wangxin0536@126.com, Tel: 0514-85599178

\* 通信作者: 徐步(1964-), 男, 研究员, E-mail: bu\_xu@yahoo.com.cn

(ELISA)<sup>[8-9]</sup>和间接免疫荧光试验(IFA)<sup>[5,10-11]</sup>,这2种方法利用对内源性ALV具有抗性的DF-1细胞可以检测出是否感染外源性ALV。有关研究表明<sup>[11]</sup>,IFA和ELISA在检测ALV-J在DF-1细胞上增殖时,因病毒接种剂量的不同而有差异。本试验在此基础上,对接种不同ALV-J剂量和维持不同时间段的DF-1细胞,分别运用ELISA和IFA进行检测,并对检测结果进行比较分析,以期获得更快捷、准确、灵敏的检测方法,为加快鸡群禽白血病的净化进程、减少误差提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒及细胞来源

ALV-J NX0101株为山东农业大学动物科技学院家禽肿瘤病实验室2002年从宁夏肉用型种鸡分离所得<sup>[12]</sup>;特异性单抗JE9仅和ALV-J亚群发生反应,不与ALV-A、B、C、D和E亚群反应<sup>[10]</sup>;DF-1细胞系山东农业大学动物科技学院家禽肿瘤病实验室惠赠。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清、DMEM购自Hyclone公司;FITC标记的羊抗鼠二抗购自Sigma公司;禽白血病毒抗原检测试剂盒购自IDEXX公司。

### 1.3 ELISA检测病毒P27抗原

DF-1细胞系经放大培养传代至24孔板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,NX0101病毒液(P27 S/P值为2.05,病毒浓度为10<sup>3.625</sup>TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup>)分别按1:1、1:10、1:100、1:1000稀释,待细胞生长至对数期时,以上病毒原液及各浓度稀释液分别接种100μL至24孔板中,吸附培养2h后换含有1%胎牛血清的DMEM维持液,分别维持培养1、2、3、5、7和9d,每个浓度各维持时间段设8个重复孔,吸取病毒培养液上清,用禽白血病毒抗原检测

试剂盒检测特异性P27抗原。

### 1.4 IFA检测病毒感染

24孔板中接种ALV-J的DF-1细胞,分别维持1、2、3、5、7和9d后,用1×PBS液轻轻冲洗1次,再用乙醇:丙酮(2:3)固定6min,而后用单抗JE9(1:400稀释)37℃孵育45min,1×PBS洗涤3次,再用FITC标记的羊抗鼠IgG抗体37℃孵育45min,弃去二抗,经1×PBS洗涤3次,每孔加50μL 50%甘油后,在荧光倒置显微镜下对每个不同接种浓度、不同维持时间的DF-1细胞分别观察,记录病毒感染情况。

## 2 结果

### 2.1 ELISA检测病毒P27抗原

接种剂量在10<sup>3.625</sup>TCID<sub>50</sub>~10<sup>3.314</sup>TCID<sub>50</sub>时,维持培养第3天ELISA检测P27为阳性;接种剂量在10<sup>2.625</sup>TCID<sub>50</sub>~10<sup>1.625</sup>TCID<sub>50</sub>时,维持培养7~9d以上ELISA检测为阳性;接种剂量在10<sup>0.625</sup>TCID<sub>50</sub>时,维持培养9dELISA检测依然为阴性。以接种10<sup>3.625</sup>TCID<sub>50</sub>的NX0101病毒原液为例,维持1~2d,8个重复样品ELISA检测结果均为阴性,S/P值分别在0.002~0.017和0.004~0.027;维持3d后开始出现阳性,S/P值在0.659~0.821;维持5~9d后ELISA检测结果均为阳性,S/P值分别为0.945~1.422、1.601~1.834、1.614~1.949。其病毒P27抗原的检测从维持第3天出现阳性,随着维持时间的增长,ELISA检测P27的S/P值逐渐增高;维持7~9d时S/P值最高。但对单个重复孔而言,随着维持时间的增长,P27抗原的S/P值在1~7d内逐渐增大,当维持至第9天,有3/8的样品S/P值略有降低,这与细胞的生长状态及试剂盒的灵敏性有关(图1)。

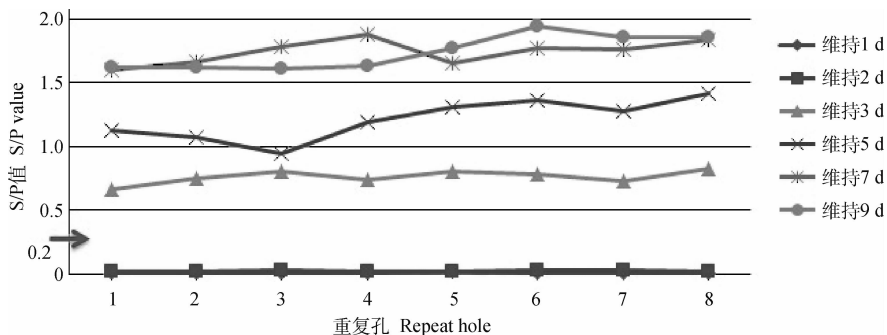
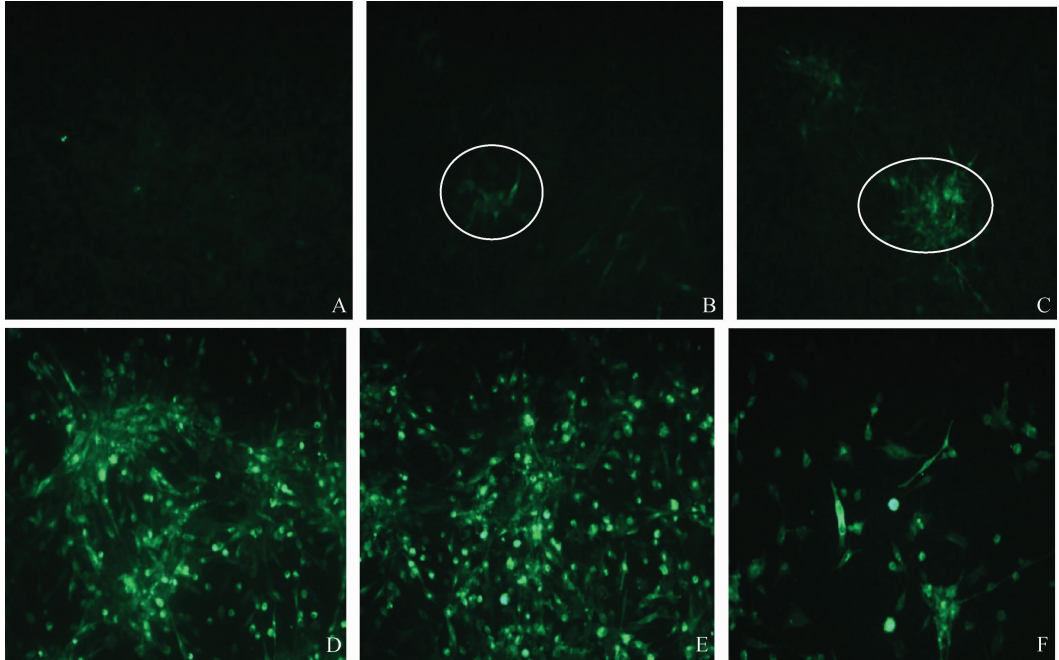


图1 10<sup>3.625</sup>TCID<sub>50</sub>的病毒接种DF-1细胞维持不同天后ELISA检测P27抗原的动态变化  
Fig. 1 Comparison of dynamic detection with ELISA kits to subgroup J of ALV

## 2.2 IFA 检测病毒感染

病毒接种剂量在  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{3.314}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养第 2 天 IFA 检测结果为阳性;接种剂量在  $10^{2.625}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{1.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养第 3~5 天 IFA 检测为阳性;接种剂量在  $10^{0.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养 7 d IFA 检测为阳性。以接种病毒剂量为  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 为例,维持培养 1 d 后,IFA 检测

结果为阴性;维持培养 2 d,视野中可以看到细胞质中有绿色荧光、胞核中无荧光的二三成簇的感染细胞,感染细胞占视野总细胞的 1%~5%;维持 3 d,可以看到成团的感染细胞,感染率在 10%~30%;维持培养 5~7 d,感染率在 70%以上;维持 9 d,IFA 检测结果虽为阳性,但大部分细胞开始脱落。见图 2。



A.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞维持培养 1 d 后 IFA 检测结果;B.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后维持培养 2 d 后 IFA 检测结果;C.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后维持培养 3 d 后 IFA 检测结果;D.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后维持培养 5 d 后 IFA 检测结果;E.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后维持培养 7 d 后 IFA 检测结果;F.  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后维持培养 9 d 后 IFA 检测结果

A. DF-1 cell cultured for 1 day after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101; B. DF-1 cell cultured for 2 days after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101; C. DF-1 cell cultured for 3 days after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101; D. DF-1 cell cultured for 5 days after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101; E. DF-1 cell cultured for 7 days after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101; F. DF-1 cell cultured for 9 days after inoculated with  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> NX0101

图 2  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> 的病毒接种 DF-1 细胞后不同维持时间 IFA 检测的动态变化

Fig. 2 Comparison of dynamic detection with IFA to subgroup J of ALV

## 2.3 ELISA 与 IFA 检测结果相关性分析

通过 5 个不同浓度梯度的接种量、6 个不同时间段的维持培养,检测结果表明,病毒接种量在  $10^{3.625}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{3.314}$  TCID<sub>50</sub> 时,ELISA 检测相对 IFA 滞后 1 d;病毒接种量在  $10^{2.625}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{1.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,ELISA 检测相对 IFA 滞后 4 d,当病毒接种量在  $10^{0.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养 9 d 时 ELISA 检测 P27 依然是阴性,而 IFA 检测结果已为阳性。试验表明,随病毒接种剂量的减少,ELISA 相对 IFA 滞后的时间也在不断增长。IFA 能快速、直观、准确地检测出病毒感染情况,而检测病毒培养上清

P27 抗原的 ELISA 相对 IFA 明显滞后(表 1)。

## 3 讨论

鸡群中发现禽白血病已有近百年的历史,中国在引用肉用型种鸡的同时也引进了 J 亚群禽白血病病毒。血清学调查表明,2008 至 2009 年中国 ALV-J 感染呈阳性的鸡群达 52.8%(105/199 群),个体感染率为 5.7%(855/15 122 羽)<sup>[13]</sup>。中国国内有几家大型养鸡场已开始禽白血病的净化工作,并取得了部分成效。ALV 净化采用的方法主要是 ELISA

检测 P27 抗原和 IFA 检测感染细胞。对于 ELISA 检测,采用对内源性 ALV 有抗性的 DF1 细胞,接种血浆样品(或组织研磨过滤样品)维持培养一定时间后,检测培养上清中的抗原蛋白 P27,这种方法可以检测出培养细胞上清样品中是否具有外源性 ALV。但有研究表明,试剂盒 ALV 的检出时间与病毒接种量存在很大相关性<sup>[14]</sup>,接种剂量是影响检测时间和效果的关键因素<sup>[15]</sup>。本试验也显示,在接种剂量高于  $10^{3.314}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养 3 d ELISA 检测为阳性;接种剂量在  $10^{2.625}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{1.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养 7 d ELISA 检测为阳性;接种剂量低于  $10^{0.625}$  TCID<sub>50</sub> 时,维持培养 9 d ELISA 检测依然是阴性。由此可见,ELISA 检测法对较高剂量的接种可在培养 3~5 d 内检测出来;但对较低接种量,需

要较长的时间(至少 7 d)。当接种剂量过低( $< 10^{0.625}$  TCID<sub>50</sub>)时,ELISA 检测会出现假阴性现象。因此,ELISA 检测需在保证细胞生长状态良好的前提下,维持培养的时间越长越好。与 ELISA 相比,IFA 检测需要保证细胞的良好状态,制备合格的病毒感染飞片,对试验人员的技术性、稳定性要求较高。但 IFA 能准确无误地检测所有样品,比较直观地看到感染的细胞,且在接种相同剂量后,IFA 比 ELISA 至少早 1~2 d 检出结果,大大提高了效率。总之,在 ALV-J 的检测及净化过程中,ELISA 方法适合大型种禽公司大规模的免疫检测及净化;IFA 对检测人员要求较高,适合小规模鸡群检测。实际工作中 2 种方法结合起来,会大大提高工作效率。

表 1 不同接种剂量维持不同时间后 IFA 和 ELISA 检测结果比较

Table 1 Comparison of dynamic detection with IFA and ELISA to subgroup J of ALV

维持时间/d Main tenance days	检测方法 Detection methods	病毒滴度/(TCID <sub>50</sub> · mL <sup>-1</sup> ) Virus titer					空白对照 Negative control
		10 <sup>3.625</sup>	10 <sup>3.314</sup>	10 <sup>2.625</sup>	10 <sup>1.625</sup>	10 <sup>0.625</sup>	
1	ELISA	-	-	-	-	-	-
	IFA	-	-	-	-	-	-
2	ELISA	-	-	-	-	-	-
	IFA	+	+	-	-	-	-
3	ELISA	+	+	-	-	-	-
	IFA	+	+	+	-	-	-
5	ELISA	+	+	-	-	-	-
	IFA	+	+	+	+	-	-
7	ELISA	+	+	+	-	-	-
	IFA	+	+	+	+	+	-
9	ELISA	+	+	+	+	-	-
	IFA	+	+	+	+	+	-

+. 检测结果阳性;-. 检测结果阴性

+. The result is positive; -. The result is negative

#### 参考文献:

- [1] PAYNE L N, FADLY A M. Leukosis/Sarcoma group [M]//Diseases of Poultry. Calnek B W. Iowa State University Press, Ames, USA, 1997, 414-466.
- [2] PAYNE L N. HPRS-103; a retrovirus strikes back.

- The emergence of subgroup J avian leukosis virus[J]. *Avian Pathol*, 1998, 27(Supp. 1): S36-S45.
- [3] PAYNE L N, HOWES K, GILLESPIE A M. Host range of Rous sarcoma virus pseudo type RSV (HPRS-103) in 12 avians species; support for a new avian retrovirus envelop subgroup, designed J [J]. *J Gen Virol*, 1992, 73(11):2995-2997.

- [4] 杜 岩,崔治中,秦爱建.从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒[J]. 中国家禽, 1999(1):1-4.
- [5] 徐镔蕊,董卫星,余春明,等.用 ALV-J gp85 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.
- [6] 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.
- [7] SUN S, CUI Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukosis virus infections in Chinese local "yellow" chickens [J]. *Avian Pathol*, 2007, 36(3): 221-226.
- [8] 王 鑫,李德庆,边小明,等.海兰褐产蛋鸡 ALV-J 亚型相关纤维肉瘤的鉴别诊断及人工造病试验[J]. 中国兽医科学,2012,42(6):582-586.
- [9] 秦爱建,刘岳龙,周绮雯,等.J 亚群禽白血病病毒的免疫荧光检测效果[J]. 中国预防兽医学报,2001,23(3):214-216.
- [10] 秦爱建,崔治中,LEE L,等.抗 J 亚群禽白血病病毒囊膜糖蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性[J]. 畜牧兽医学报,2001,32(6):556-562.
- [11] DONG X, LIU J, LI D Q, et al. Comparison of IFA and ELISA in the detection of avian leukosis virus subgroup J in DF-1 cell cultures [J]. *Inter J Vet Sci*, 2012, 1(1):13-15.
- [12] 张 志,赵宏坤,崔治中.宁夏肉用种鸡 J 亚群禽白血病的实验室诊断[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(11): 25-26.
- [13] 崔治中.鸡白血病及其鉴别诊断和预防控制[J]. 中国家禽,2010,32(8):1-12.
- [14] 郭慧君,李中明,李宏梅,等.3 种 ELISA 试剂盒检测不同亚型外源性鸡白血病病毒的比较[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(3):310-314.
- [15] 李 薛,李德庆,赵 鹏,等.ELISA 与 IFA 检测鸡血清 ALV-A/B 特异性抗体相关性研究[J]. 病毒学报, 2012,28(6):615-620.

(编辑 白永平)