

皖南黄肉种鸡种蛋中禽白血病病毒的感染状态检测

王波¹, 李清源¹, 刘绍琼¹, 张永光³, 崔治中^{1,2*}, 孙淑红^{1,2*}

(1. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018; 2. 山东省动物生物技术与疫病防治重点实验室, 泰安 271018; 3. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

摘要: 本研究首次通过检测种蛋中禽白血病病毒(ALV)评价了皖南黄父母代肉种鸡的 ALV 感染状态。收集该鸡群的 120 枚鸡蛋, 取 40 枚鸡蛋孵化至 9~11 d 后分别制备 CEF, 培养 10 d, 取细胞上清用 ELISA 试剂盒检测 ALV p27 抗原。另取 80 枚鸡蛋卵白直接检测 p27 抗原, 同时分别将 80 枚鸡蛋卵白接种 CEF(DF1), 培养 10 d 后取细胞上清检测 p27 抗原。比较 p27 阳性检出率的结果表明, 受精蛋孵化 9~11 d 后制备 CEF, 再培养 10 d 的细胞上清检出率(10/36)高于直接检测卵白(17/80)与卵白接种 CEF(DF1)的细胞上清(7/80)。将经 DF1 培养后 p27 抗原阳性样品, 用针对 ALV-J 的单抗 JE9 做 IFA, ALV-J 的阳性率为 6/7。检测该 80 枚鸡蛋的卵黄抗体, ALV-J、ALV-AB 的抗体阳性率分别为 18/80、1/80。结果表明, 该皖南黄父母代肉种鸡群存在的外源性 ALV 感染主要为 ALV-J。该研究为 ALV 的净化提供了可行性检测方法。

关键词: 皖南黄肉种鸡; 种蛋; 禽白血病病毒; 感染状态

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0224-04

Evaluation on ALV Infection in Fertilized Eggs from A Wan-nan Yellow-feather Parent Broiler Breeder Flock

WANG Bo¹, LI Qing-yuan¹, LIU Shao-qiong¹, ZHANG Yong-guang³, CUI Zhi-zhong^{1,2*}, SUN Shu-hong^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Taian 271018, China; 3. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: In the present study, the infection of avian leukosis virus (ALV) in parent breeder flock was evaluated by the inspection of fertilized eggs. 120 eggs were obtained for a flock of Wan-nan yellow-feather parent layers. 40 eggs were hatching for 9 to 11 days for the preparation of CEF, which were cultured for 10 days and the supernatants were collected for the measurement of p27 antigen by ELISA. The egg white was obtained from the other 80 eggs and used for the direct measurement of p27 antigen or indirect measurement after inoculation with CEF (DF1) and cultured for 10 days. The results showed that ALV positive rate (10/36) was higher in the measurement with cultured CEF than that in the determination with egg white (17/80) or egg white inoculated with CEF (7/80). The ALV-J positive rate in DF1 positive samples was 6/7 by the measurement of IFA with JE9, a monoclonal antibody to ALV-J. The positive rates of ALV-J and ALV-AB in egg yolk antibody were 18/80 and 1/80, respectively. The results showed that

收稿日期: 2010-07-09

基金项目: 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放课题资助(SKLVEB2010KFKT001); 国家公益性行业(农业)科技专项(200803019)

作者简介: 王波(1985-), 男, 山东曲阜人, 山东农业大学 2004 级本科生, E-mail: wb8532@163.com

* 通讯作者: 崔治中(1944-), E-mail: zzcui@sdau.edu.cn; 孙淑红(1968-), E-mail: sunshuhong@sdau.edu.cn

the parent flock was infected with ALV-J. The result suggests that the measurement of ALV antigen from eggs is an available method for the detection of ALV infection.

Key words: Wan-nan yellow-feather parent breeder flock; fertilized eggs; avian leukosis viruses; infection status

禽白血病病毒(ALV)根据病毒囊膜蛋白与病毒的宿主特异性相关的 gp85 蛋白抗原性的不同分为 A~J 10 个亚群,其中只有 A、B、C、D、E 和 J 亚群能感染鸡。ALV 净化主要是清除致病性的外源性 ALV。外源性 ALV 以 A 和 J 群为主,也是流行最广泛的 2 个外源性病毒群。ALV-J 自 20 世纪 80 年代后期从肉用型鸡中发现后已在世界各国普遍流行^[1-7]。我国近十年来没有在全国范围内对 ALV 采取有效的净化措施,至目前,在地方品系鸡群中已经存在不同亚型的 ALV 感染^[8-9]。

本研究从皖南黄肉种鸡群收集 120 枚种蛋,试图通过对种蛋中 ALV 的检测实现对皖南黄父母代肉种鸡 ALV 感染状态的评价。

1 材料与方法

1.1 种蛋

42 周龄皖南黄肉种鸡所产受精蛋 120 枚,编号 1#~120#。

1.2 卵白中 ALV p27 抗原的直接检测

分别取 80 枚鸡蛋卵白,直接用 ELISA 试剂盒检测 ALV p27 抗原。

1.3 卵白接种细胞后 ALV p27 抗原的检测

分别取 51 份卵白接种 CEF,29 份接种 DF1,培养 10 d 后分别取细胞上清检测 p27 抗原。如 CEF 细胞上清为阳性,则接种 DF1 继续培养 9 d 后再检测细胞上清中的 p27 抗原,以确定是否存在外源性 ALV 感染。DF1 细胞由作者实验室保存。

1.4 鸡胚孵化后 p27 抗原检测

将另 40 枚鸡蛋孵化 9~11 d 后分别制备 CEF,培养 10 d,取细胞上清检测 p27 抗原。阳性样品再分别接种 DF1 细胞。

1.5 卵黄中 ALV-J 抗体、ALV-AB 抗体的检测

分别采集 80 枚种蛋的蛋黄(与种蛋的卵白编号一一对应)。用 ELISA 试剂盒分别检测卵黄中 ALV-J 抗体、ALV-AB 抗体。卵黄样品的稀释同血清样品。

ALV p27 抗原、ALV-J 抗体与 ALV-AB 抗体检测用 ELISA 试剂盒均来自 IDEXX。

1.6 单克隆抗体与酶标二抗

ALV-J 单克隆抗体 JE9 由美国农业部肿瘤研究所提供,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠二抗购自 SIGMA 公司,工作浓度为 1:160 稀释。

1.7 ALV-J 的 IFA 检测

将 DF1 细胞培养的经 ELISA 试剂盒检测出阳性的样品,分别传至有飞片的平皿中。继续培养 7 d 后,固定飞片用 ALV-J 的单抗 JE9 做 IFA 检测。

2 结果

2.1 种蛋中 ALV p27 抗原的检测结果比较

80 枚鸡蛋卵白直接检测 ALV p27 抗原的阳性率为 17/80。其中,卵白接种 CEF 51 份、DF1 29 份。p27 抗原检测结果显示,7/80 的样品存在外源性 ALV 感染;结果表明,卵白接种 DF1 的 p27 阳性率(3/29)高于接种 CEF 的阳性率(4/51)。40 枚鸡蛋孵化后制备 CEF,培养 10 d 的细胞上清中 p27 抗原的阳性率为 10/36。比较 p27 阳性检出率的结果表明,受精蛋孵化 9~11 d 后制备 CEF 再培养 10 d 的细胞上清(10/36)高于直接检测卵白(17/80)与卵白接种 CEF(DF1)的细胞上清(7/80)。结果见表 1。

2.2 卵黄中 ALV-J 抗体、ALV-AB 抗体与卵白 p27 抗原的检测结果比较

卵黄中 ALV-J 抗体、ALV-AB 抗体的检测结果见表 2(阴性样品略)。结果显示,种蛋中 ALV-J 抗体阳性率为 18/80,ALV-AB 抗体阳性率为 1/80。与卵白 p27 抗原检测结果比较表明,部分种蛋中 ALV 抗体与抗原同时存在。其中 11# 既存在 ALV-AB 抗体同时也存在 ALV 感染;63#、68# 既存在 ALV-J 抗体同时也存在 ALV 感染。

2.3 IFA 检测 ALV-J 与 ELISA 检测 p27 抗原的结果比较

IFA 检测结果表明,7 份经 DF1 培养的外源 ALV 阳性样品有 6 份 ALV-J 阳性,分别为 6#、10#、13#、24#、71#、73#。与未感染 ALV-J 的样品相比,阳性样品 CEF 的胞质内均有明显的特异性绿色荧光,细胞核未被染色呈现灰暗色(图略)。

表 1 皖南黄种蛋中 p27 抗原的阳性比率

Table 1 Positive rate of p27 in fertilized eggs of Wan-nan yellow-feather parent breeder flock

数量 Number	卵白 Egg white			种蛋孵化后制备 CEF 的 细胞上清** Eggs were hatching for the preparation of CEF**
	直接检测 Direct measurement	接种细胞 Cultured with different cells		
		CEF	DF1	
80	17/80	4/51*	3/29*	—
40	—	—	—	10/36

. 取 CEF 细胞培养阳性的细胞上清 4 份与在 DF1 培养 9 d 后已经检测为阳性的样品 3 份, 分别接种 DF1 后再培养 9 d, 取细胞上清的 p27 抗原检测结果。 *. 40 枚鸡蛋孵化至 9 d, 分别制备 CEF, 细胞培养后 10 d 后分别检测上清中 p27 抗原

*. The supernatants were measured positive samples, 4 with CEF and 3 with DF1 for 9 days. And then they were cultured for 9 days with DF1 and the supernatants were collected for the measurement of p27 antigen by ELISA.

* *. 40 eggs were hatching at 9 days for the preparation of CEF, which were cultured for 10 days and the supernatants were collected for the measurement of p27 antigen by ELISA

表 2 皖南黄种蛋卵黄中 ALV 抗体与卵白中 p27 抗原的检测结果

Table 2 Results of p27 antigen and ALV antibody in fertilized eggs of Wan-nan yellow-feather parent breeder flock

样品 Samples	卵白 Egg white	p27 抗原 p27 antigen			卵黄抗体 Egg yolk antibody	
		细胞上清 Supernatants	接种细胞类型 Type of cells	ALV-J	ALV-AB	
2 #	—	—	CEF	+	—	
6 #	+ *	+	CEF	—	—	
8 #	—	—	CEF	+	—	
9 #	—	—	CEF	+	—	
10 #	+	+	CEF	—	—	
11 #	+ *	—	CEF	—	+	
12 #	+	—	CEF	—	—	
13 #	+ *	+	CEF	—	—	
14 #	—	—	CEF	+	—	
20 #	+	—	CEF	—	—	
24 #	+ *	+	CEF	—	—	
25 #	—	—	CEF	+	—	
28 #	+	—	CEF	—	—	
32 #	—	—	CEF	+	—	
36 #	+	—	CEF	+	—	
37 #	—	—	CEF	+	—	
39 #	—	—	CEF	+	—	
41 #	—	—	CEF	—	—	
42 #	—	—	CEF	+	—	
44 #	—	—	CEF	—	—	
47 #	—	—	CEF	+	—	
48 #	+	—	CEF	—	—	
49 #	—	—	CEF	—	—	
54 #	+ *	+	DF1	—	—	
55 #	—	—	DF1	+	—	
56 #	—	—	DF1	+	—	
57 #	—	—	DF1	+	—	
60 #	—	—	DF1	—	—	
63 #	+	—	DF1	+	—	
66 #	—	—	DF1	—	—	
67 #	+	—	DF1	—	—	
68 #	+	—	DF1	+	—	
70 #	—	—	DF1	+	—	
71 #	+ *	+	DF1	—	—	
72 #	—	—	DF1	+	—	
73 #	+ *	+	DF1	—	—	
76 #	+	—	DF1	—	—	
Positive rate	17/80	7/80	—	18/80	1/80	

*. 外源性 ALV 阳性样品

* *. Positive samples of exogenous ALV

IFA 与 p27 抗原的 ELISA 检测结果比较表明,该鸡群中存在的 ALV 感染主要为 ALV-J(6/7);其中 11# 存在外源 ALV 感染,但非 ALV-J,而 ALV-AB 抗体阳性。结果见表 3。

表 3 IFA 检测 ALV-J 与 ELISA 检测 p27 抗原的比较结果
Table 3 Comparison of ALV-J by IFA and p27 antigen by ELISA

检测方法 Detection way	ELISA							
	样品 Sample	6#	10#	11#	13#	24#	71#	73#
ALV-J *		+	+	-	+	+	+	+
p27 * *		+	+	+	+	+	+	+
ALV-AB antibody		-	-	+	-	-	-	-

*. 用对 ALV-J 的单抗 JE9 做 IFA; * *. ELISA 检测 DF1 细胞上清中的 p27 抗原

*. ALV-J was measured by IFA with JE9, a monoclonal antibody to ALV-J; * *. The supernatants in DF1 were collected for the measurement of p27 antigen by ELISA

3 讨论

禽白血病病毒(ALV)引起的肿瘤病是目前危害养鸡业的主要疾病之一,已在世界范围内蔓延,对种鸡群进行检测与净化已经势在必行。本研究采集某皖南黄肉种鸡群的 120 枚种蛋对 ALV 进行了检测,评价了该皖南黄肉种鸡群 ALV 的感染状态。

所有 ALV 检测方法中,ELISA 最为常用,而 DF1 这一对内源性 ALV 有抗性的 CEF 可区分有致病性的外源 ALV,对种蛋蛋白接种 DF1 培养后的细胞上清的 ELISA 检测可用于剔除外源性 ALV 感染的种鸡。本研究采用 ELISA 方法检测了 40 枚种蛋分别制备的 CEF 与 80 枚种蛋卵白的 ALV p27 抗原、80 枚种蛋卵黄的 ALV-J、ALV-AB 抗体。比较 p27 抗原阳性检出率的结果表明,受精蛋孵化 9~11 d 后制备 CEF 再培养 10 d 的细胞上清(10/36)高于直接检测卵白(17/80)与卵白接种 CEF(DF1)的细胞上清(7/80)(表 1)。结果显示,采用种蛋孵化后制备 CEF 的方法检测 ALV 更加有利于 ALV 阳性蛋鸡的及时剔除,而且该研究方法较经典的采集抗凝血进行病毒分离的方法更为简便。

对 7 份经 DF1 培养的外源 ALV 阳性样品用对 ALV-J 的单抗 JE9 进行的 IFA 检测结果显示,其中有 6 份 ALV-J 阳性。这表明,该皖南黄肉种鸡种蛋

中感染的外源性 ALV 主要为 ALV-J(6/7)。同时还发现,外源性 ALV 及其抗体同时存在于同一枚种蛋(表 3),再次体现了 ALV 在鸡体内感染状态的复杂性。

本研究首次通过对皖南黄肉种鸡种蛋卵白中 ALV p27 抗原与卵黄中 ALV-J、ALV-AB 抗体的检测评价了该皖南黄肉种鸡群 ALV 的感染状态,为不同种鸡群 ALV 的净化提供了可行性方法,同时提供了禽白血病防控技术体系所需的实验室检测依据与可靠的流行病学资料。

致谢:山东农业大学生物学博士后流动站。

参考文献:

- [1] 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, 72:801-807.
- [2] 杜 岩, 崔治中, 秦爱建. 从市场商品肉鸡中检测出 J 亚群白血病病毒[J]. *中国家禽(学报版)*, 1999, 1: 1-4.
- [3] 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: 1321-1330.
- [4] CUI Z Z, SUN S H, WANG J X. Reduced serologic response to Newcastle disease virus in Broiler chickens exposed to a Chinese field strain of subgroup J avian leukosis virus[J]. *Avian Dis*, 2006, 50:191-195.
- [5] SUN S H, CUI Z Z. Epidemiological and pathological studies of subgroup J avian leukosis virus infections in Chinese local "yellow" chickens[J]. *Avian Pathol*, 2007, 36:221-226.
- [6] 王 辉, 崔治中. 蛋鸡 J 亚群白血病病毒的分离鉴定及序列分析[J]. *病毒学报*, 2008, 24(5): 369-375.
- [7] CUI Z Z, SUN S H, ZHANG Z, et al. Simultaneous endemic infections with subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus in commercial and local breeds of chickens[J]. *Avian Pathol*, 2009, 38(6): 443-448.
- [8] 朱美真, 吴玉宝, 崔治中. 地方品系鸡中一株 A 亚群鸡白血病病毒的分离和鉴定[J]. *中国动物传染病学报*, 2009, 17(4): 31-35.
- [9] 赵冬敏, 张青婵, 崔治中. 芦花鸡中 B 亚群禽白血病病毒的分离与鉴定[J]. *病毒学报*, 2010, 26(1): 53-57.