



郝建勇, 秦建如, 邱倩倩, 等. 不同样品对黄羽种鸡禽白血病毒净化检测效果的影响[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 29-34.

不同样品对黄羽种鸡禽白血病毒净化检测效果的影响

郝建勇, 秦建如, 邱倩倩, 袁丽霞, 饶明章, 廖 明, 曹伟胜
(华南农业大学 兽医学院/农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】评估黄羽种鸡禽白血病的净化工作, 比较源于同一鸡群不同样品对禽白血病毒(ALV)检测结果的影响。【方法】采用 ALV 抗原 ELISA 方法对广东一黄羽种鸡场采集的 2 691 枚种蛋进行检测, 根据检测结果采集其中 70 份不同 S/P 区间所对应的母鸡抗凝血, 分离血浆后分别同时接种于 CEF 和 DF-1 细胞, 用病毒分离方法进行检测, 并用 PCR 方法进行亚群鉴定。【结果和结论】从送检种蛋蛋清共检出 ALV p27 阳性样品 243 份, 阳性率为 9.03% (243/2 691); 蛋清不同 ELISA S/P 区间所对应的病毒分离情况分别为: 蛋清 ELISA S/P $\geq$ 2.0 的鸡只其血样 CEF 和 DF-1 细胞病毒分离率均为 100%; $1.5 \leq S/P < 2.0$ 的鸡只病毒分离率均为 88.9%; $1.0 \leq S/P < 1.5$ 的鸡只病毒分离率均为 85.7%; $0.2 \leq S/P < 1.0$ 的鸡只病毒分离率分别为 60% ~ 75% (CEF) 和 40% ~ 50% (DF-1); $0.1 \leq S/P < 0.2$ 的鸡只病毒分离率为 62.5% (CEF) 和 50% (DF-1); $S/P < 0.1$ 的鸡只分别为 27.2% (CEF) 和 9.1% (DF-1) 的病毒分离率。PCR 结果显示, 所有 7 份 CEF⁺DF-1⁻ 的 CEF 培养物中有 6 份为内源性 ALV-E。研究表明, 在蛋清 ELISA 检测时, S/P 越高的阳性蛋清样品其对应母鸡越可能是外源性 ALV 病毒血症阳性; 有一定比例 S/P 较低的阳性蛋清样品是由对应母鸡体内的内源性 ALV 排毒所致; 而净化初期少数蛋清 S/P 为阴性的蛋清, 其对应母鸡仍可能检出外源性 ALV, 说明在黄羽种鸡外源性 ALV 净化方案中单独使用 1 次蛋清 ELISA 检测可能会给禽白血病的净化检测造成一定的“误诊”和“漏检”。

关键词:黄羽种鸡; 禽白血病毒; 病毒检测; 净化
中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)06-0029-06

Effects of different samples on avian leukosis virus eradication and detection in yellow feather breeders

HAO Jianyong, QIN Jianru, QIU Qianqian, YUAN Lixia, RAO Mingzhang, LIAO Ming, CAO Weisheng
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of
Veterinary Vaccine Development, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】The avian leukosis (AL) eradication protocol in yellow feather breeders was evaluated and the effects of different albumen samples from the same breeder chickens on the results of avian leukosis virus (ALV) detection were compared. 【Method】A total of 2 691 albumen samples collected from a yellow feather breeders of Guangdong Province were tested using ALV p27 antigen ELISA. Seventy plasma samples were collected from corresponding hens based on the different S/P intervals results for virus isolation in CEF and DF-1 cells respectively, and the results were analyzed. PCR was used to identify subgroup. 【Result and conclusion】A total of 243 positive samples were detected in this local breeder

收稿日期:2015-01-31 优先出版时间:2015-10-16
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20151016.1446.014.html>
作者简介:郝建勇(1987—),男,硕士研究生,E-mail:haojianyong@163.com;通信作者:曹伟胜(1975—),男,副教授,博士,
E-mail:caoweish@scau.edu.cn
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203055);国家肉鸡产业技术体系(CARS-42-G09);广东省科技计划项目(2012A020100001)

flock , and the ALV p27 positive rate was 9.03% (243/2 691) . The virus isolation ratios (VIR) at different S/P intervals were found as follows: both 100% VIR in CEF and DF-1 cells of hens' plasma samples with albumen $S/P \geq 2.0$; both 88.9% VIR with $1.5 \leq S/P < 2.0$; both 85.7% VIR with $1.0 \leq S/P < 1.5$; 60% - 75% (CEF) and 40% - 50% (DF-1) with $0.2 \leq S/P < 1.0$; 62.5% (CEF) and 50% (DF-1) with $0.1 \leq S/P < 0.2$; 27.2% (CEF) and 9.1% (DF-1) with $S/P < 0.1$. The PCR detection showed that six of seven CEF⁺ DF-1⁻ proviral DNA were positive with endogenous ALV-E and one positive with ALV-J. The results indicated that in albumen ELISA detection, the higher S/P value of positive albumen samples, the more likely exogenous ALV viremia positive in their corresponding hens. The corresponding hens of low S/P value of positive albumen samples were caused by a certain proportion of endogenous virus; it is noteworthy that exogenous ALV can still be isolated from some ELISA negative chickens at the beginning of eradication. This study suggests some "misdiagnosed" and "missed" chickens may be caused by using only one method of albumen p27 antigen ELISA.

Key words: yellow feather breeder; avian leukosis virus; virus detection; eradication

禽白血病 (Avian leukosis , AL) 是由甲型反转录病毒属的禽白血病病毒 (Avian leukosis virus , ALV) 引起的一种禽类肿瘤性传染病,临床上多以生产性能下降、免疫抑制、多个器官组织出现肿瘤为特征^[1]. 通常依据病毒血清中和试验、囊膜糖蛋白特性和宿主范围等将 ALV 分为 A ~ J 共 10 个亚群,其中只有 A、B、C、D、E 和 J 亚群 ALV 来源于鸡. 2012 年,王鑫等^[2]从我国芦花鸡中分离出 3 株疑似新亚群 (K 亚群) ALV.

根据 ALV 的自然传播方式和病毒复制的生物学特性,可将其分为外源性病毒和内源性病毒. 外源性 ALV 是指不会通过宿主细胞染色体传递的病毒,而以病毒粒子形式进行垂直和水平传播,包括 A、B、C、D、J 亚群,其中 A、B、J 是常见的外源性 ALV,致病力较强. 因此,这些外源性病毒是 AL 净化的重要对象. 内源性 ALV 是指前病毒 cDNA 可永久性整合进宿主细胞染色体基因组的病毒,可通过染色体垂直传播,主要是指 E 亚群,一般致病力较弱或不致病,但它可干扰对外源性 ALV 感染的检测,给 ALV 的净化工作带来了很大的困难^[3].

近年来,AL 在我国各地仍然广泛流行^[4-5],特别是在 2006—2009 年间,ALV-J 诱发的血管瘤给我国商品蛋鸡造成了巨大的经济损失^[6]. 在《国家中长期动物疫病防治规划 (2012—2020)》和《全国肉鸡遗传育种改良计划 (2014—2025)》中均将 AL 列入重点防治对象和疾病净化目标. 为了控制 ALV 的流行,崔治中等^[7]拟定针对我国不同种禽场可选择实施不同的 ALV 净化方案.

外源性 ALV 的净化检测可从感染鸡的胎粪、泄殖腔拭子、血液、精液和蛋清等样品中进行. 在不同

<http://xuebao.scau.edu.cn>

公司的禽白血病净化方案中,蛋清通常被列为非常重要的检测对象,即通过 p27 抗原 ELISA 频度检测蛋清,根据检测结果淘汰阳性鸡,从而尽可能阻止 ALV 经种蛋垂直传播. 但是这种方法的先天不足在于现有商品化试剂盒不能区分内源性和外源性病毒. 目前国内外公认检测外源性 ALV 的“金标准”是病毒分离. 病毒分离常用血浆样品,近年来也有研究开始分析不同品种鸡蛋清病毒分离的结果^[8-10].

广东是黄羽肉鸡产业的重要生产和消费大省. 近些年来 AL 也一直困扰黄羽肉鸡产业的健康发展. 可喜的是,广东省一些黄羽种鸡品系相继启动了外源性 ALV 的净化工作. 在对蛋清的净化检测结果分析过程中,有不少黄羽种鸡场的管理人员和兽医工作者经常问到同一个问题:即黄羽种鸡场蛋清 p27 抗原 ELISA 阳性鸡是否真的为外源性 ALV 带毒鸡. 因此,本研究拟对广东省一黄羽种鸡的蛋清样品进行 ALV 抗原 ELISA 检测,进而采集蛋清 ELISA 阳性样品对应母鸡的血浆样品分别同时接种 CEF 和 DF-1 细胞进行病毒分离,以比较蛋清 ELISA 检测和血浆病毒分离之间的对应关系,从而为该黄羽种鸡群中 AL 的防控及净化方案提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 蛋清样品采集

从广东一黄羽种鸡场送检的 2 691 枚育种核心群种蛋中逐个吸取蛋清 1 mL 置于 1.5 mL 离心管, - 80 ℃ 条件下保存备用.

1.2 试剂和仪器

ALV 抗原检测试剂盒 (ALV Antigen Test Kit) 为 IDEXX 公司产品; DMEM、FBS 和 Trypsin 均为 Gibco

公司产品;pMD18-T 载体、Go Taq DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品;SQ Tissue DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品;大肠埃希菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5 α 购于天根生化科技有限公司;DF-1 细胞为农业部兽用疫苗创制重点实验室保存;鸡胚成纤维细胞(CEF)使用 SPF 鸡胚(北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供)制备;Bio-tek Elx800 型酶标仪、凝胶成像及分析系统、高速低温离心机等仪器均由农业部兽用疫苗创制重点实验室提供。

1.3 蛋清 ALV p27 抗原 ELISA 检测

将 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的蛋清反复冻融 3 次,参照 IDEXX 公司 ALV 抗原检测 ELISA 试剂盒使用说明书进行 p27 抗原检测,并计算其 S/P 值.判定标准如下: $S/P < 0.2$ 为阴性, $S/P \geq 0.2$ 为阳性。

1.4 细胞培养与病毒分离

参考文献[11]并有所改进.根据“1.3”中检测结果,立即采集其中 70 份不同区间 S/P 值($S/P \geq 2.0$, $1.5 \leq S/P < 2.0$, $1.0 \leq S/P < 1.5$, $0.5 \leq S/P < 1.0$, $0.2 \leq S/P < 0.5$, $0.1 \leq S/P < 0.2$, $S/P < 0.1$)所对应的母鸡抗凝血,无菌操作分离血浆后分别同时接种于 24 孔板中的 CEF 细胞悬液($1.7 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)和 DF-1 细胞悬液($1.7 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)中,每孔接种 50 μL 血浆,每个样品接种 2 孔,同时设立 DMEM 阴性对照和接种已知 ALV 的阳性对照各 2 孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养,待细胞长至单层,换为体积分数 1% 的 FBS 细胞维持液再连续培养 7 d,然后将 CEF 和 DF-1 细胞培养物反复冻融 3 次,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,离心后的细胞上清液 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用;细胞沉淀用于提取 ALV 前病毒基因组 DNA。

1.5 细胞上清 ELISA 检测与数据统计

细胞上清 ELISA 检测操作方法同“1.3”.并使用 EXCEL 软件对试验数据进行处理和统计分析。

1.6 前病毒 DNA 的制备

参照“1.5”中的检测结果收集“1.4”中的 CEF 阳性且 DF-1 阴性(CEF $^{+}$ DF-1 $^{-}$)和 1 份 CEF、DF-1 均为阴性(CEF $^{-}$ DF-1 $^{-}$)的 CEF 细胞沉淀,并随机选取不同区间 CEF 和 DF-1 均阳性(CEF $^{+}$ DF-1 $^{+}$)的 DF-1 细胞沉淀 13 份(A~F 每个区间 2 份,G 区间 1 份),按照 SQ Tissue DNA 试剂盒 OMEGA 公司说明书提取基因组 DNA, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

1.7 引物合成和 ALV 亚群鉴定

参照文献[11]以及 GenBank 中已公开发表的 ALV 序列分别合成用于扩增 ALV-A、ALV-B、ALV-J 和 ALV-E 的特异性 PCR 分型鉴定引物,其扩增产物预计大小分别为 690、1 100、1 250、545 bp。

1.8 分离株 gp85 基因的扩增和测序

参考文献[12]合成扩增 ALV-J gp85 基因的特异性引物,其扩增产物预计大小为 924 bp.按照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书对 PCR 产物进行回收,然后将胶回收产物连接到 pMD18-T 载体,再将连接产物转化大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α ,将经菌液 PCR 鉴定阳性质粒送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.9 gp85 基因的序列分析

利用 DNASTar7.1 基因分析软件对测序结果进行核苷酸序列的剪辑和拼接.将分离株的 gp85 基因核苷酸序列与 GenBank 中已公开发表的国内外各参考毒株的 gp85 基因核苷酸序列进行相似性分析,并用 MEGA5.0 绘制分离毒株与各参考毒株 gp85 基因序列的系统进化图谱.各亚群 ALV 参考毒株:RAV-0 (M12172), RAV-1 (M19113), RAV-2 (M14902), PragueC (J02342), SR-D (M22730), HPRS103 (Z46390), NX0101 (DQ115805), HN06 (HQ900844), SCAU11-H (KC149972), SCAU11-XG (KC149971), ADOL-7501 (AY027920), CAUGX01 (HM640943), WLY13 (KJ631311), AHaq02 (KF534753), ZH08 (HQ316166), GD06SL1 (EF107624)。

2 结果

2.1 蛋清样品 ALV 抗原 ELISA 检测

对来自广东一黄羽种鸡场育种核心群的 2 691 枚种蛋进行了 ALV p27 抗原 ELISA 检测,其中共检出 243 份阳性样品,则该批送检种蛋的 ALV p27 抗原阳性率为 9.03%。

2.2 CEF 和 DF-1 细胞的病毒分离结果

根据“2.1”中的检出结果,参照步骤“1.4”,将蛋清对应编号母鸡的血浆样品分别同时用 CEF 细胞和 DF-1 细胞进行病毒分离,结果如表 1 所示. DF-1 细胞病毒分离总阳性率为 60% (42/70), CEF 细胞病毒分离总阳性率为 70% (49/70),进一步分析后发现,DF-1 细胞病毒分离阳性的样品,其 CEF 细胞病毒分离结果也均呈阳性。

表 1 血浆样品细胞培养物的 ALV 抗原 ELISA 检测结果¹⁾
Tab.1 The results of ALV antigen-ELISA test of plasma cell cultures 阳性率/%

细胞	$S/P \geq 2.0$	$1.5 \leq S/P < 2.0$	$1.0 \leq S/P < 1.5$	$0.5 \leq S/P < 1.0$	$0.2 \leq S/P < 0.5$	$0.1 \leq S/P < 0.2$	$S/P < 0.1$	合计
DF-1	100(13/13)	88.9 (8/9)	85.7 (6/7)	50 (6/12)	40 (4/10)	50.0(4/8)	9.1 (1/11)	60(42/70)
CEF	100(13/13)	88.9 (8/9)	85.7 (6/7)	75(8/12)	60(6/10)	62.5(5/8)	27.2 (3/11)	70(49/70)

1) 括号内数据为“呈阳性样品数/总检测样品数”。

2.3 CEF 和 DF-1 细胞病毒分离的相关性

以 DF-1 细胞病毒分离率(x)为横坐标,CEF 细胞病毒分离率(y)为纵坐标,建立回归线性方程(图 1),线性关系方程为 $y=0.723\ 7x+0.275\ 2$,相关系数为 0.939 3,说明这 2 种细胞的 ALV 分离结果符合率高度相关,检测结果准确、可靠。

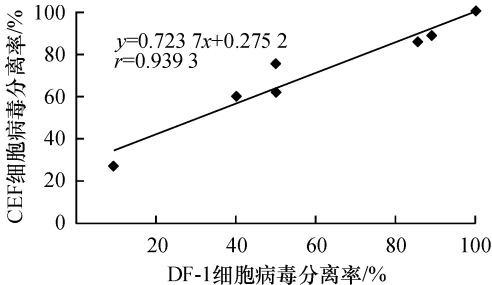


图 1 CEF 和 DF-1 细胞病毒分离相关性分析
Fig.1 Correlation analysis of virus isolation in CEF and DF-1 cells

2.4 PCR 亚群鉴定结果

对 CEF⁺DF-1⁻的全部 7 份 CEF 细胞样品及 1 份 CEF⁻细胞样品分别标记为 1~8,另外从 7 个不同区间中随机选取 13 份 CEF⁺DF-1⁺的 DF-1 细胞样品标记为 9~21,然后进行 PCR 亚群鉴定.8 份 CEF 细胞样品中有 6 份(0.5≤ S/P <1.0、 S/P <0.1 区间各 2 份,0.2≤ S/P <0.5、0.1≤ S/P <0.2 区间各 1 份)扩增片段大小为 1 250 bp 左右,与 ALV-E 特异性片段大小相一致,有 1 份(来自 0.2≤ S/P <0.5 区间)片段大小为 545 bp,与 ALV-J 亚群特异性片段大小相一致,阴性细胞没有条带(图 2);而另 13 份 DF-1 细胞样品 PCR 产物的大小均为 545 bp,与 ALV-J 片段大小相一致(图 3),说明该黄羽种鸡育种核心群不仅存在具有复制能力的内源性 ALV,而且存在外源性 ALV-J.

2.5 gp85 基因 PCR 扩增结果

以提取的 DF-1 细胞培养物 cDNA 为模板,用 gp85 特异性引物进行 gp85 基因的扩增,分离出 3 株 ALV-J,分别命名为 GD1401J、GD1402J、GD1403J. 其 gp85 基因大小均为 924 bp,与预期大小一致(图 4).

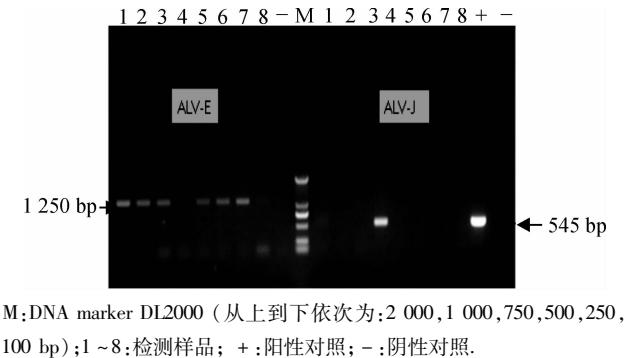


图 2 CEF 细胞培养物的 ALV PCR 检测
Fig.2 ALV PCR detection of CEF cell cultures

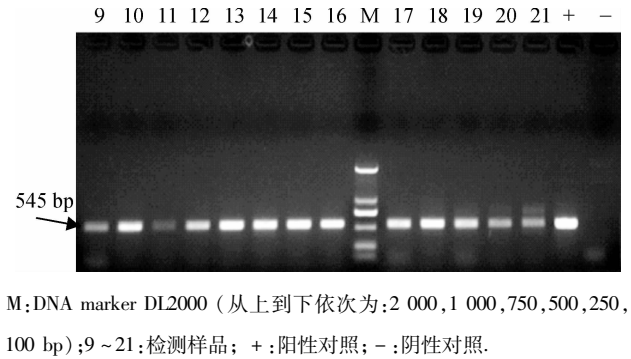


图 3 DF-1 细胞培养物的 ALV PCR 检测
Fig.3 ALV PCR detection of DF-1 cell cultures

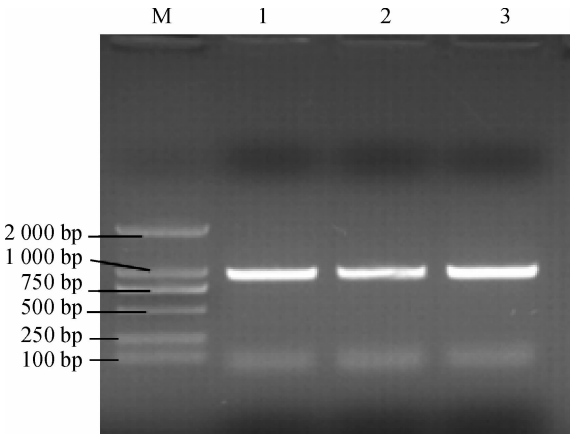


图 4 gp85 基因的 PCR 扩增
Fig.4 PCR amplification of the gp85 gene

2.6 分离株 gp85 基因的序列分析

利用 DNASTar 软件分别对 ALV-J 分离株 GD1401J、GD1402J 和 GD1403J 的 gp85 基因序列进行剪辑和拼接,结果显示这 3 个毒株的 gp85 核苷酸序列长度均为 924 bp,它们之间的核苷酸相似性达到 98.8%~99.8%.与 GenBank 中已公开发表的国内外不同 ALV 分离株 gp85 基因核苷酸序列进行相似性比较,发现这 3 个分离株的 gp85 基因与 ALV-A、B、C、D、E 亚群的 gp85 基因相似性只有 49.3%~49.9%,与 ALV-J 的 gp85 基因相似性高达 87.4%~100%.其中,与国外 ALV-J 分离株 ADOL-7501 相似性达 87.4%~87.5%;与 ALV-J 原型株 HPRS103 的相似性为 97.7%~98.1%;与国内广东地区部分分离株的相似性为 92.3%~94.8%,与安徽分离株 AHaq02 的相似性最高分别为 99.8%、100%、99.0%.各亚群的 gp85 基因系统进化树显示,3 个分离株与 AHaq02 位于同一个进化分支上,而与 J 亚群原型株 HPRS103 位于同一个大的进化分支上(图 5).

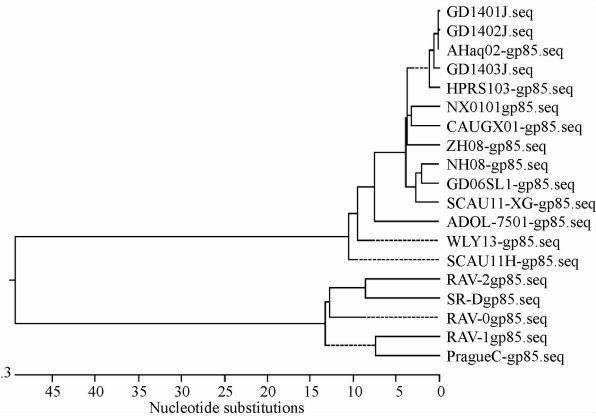


图5 ALV-J gp85 基因的核苷酸序列遗传进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of ALV-J gp85 gene

3 讨论与结论

禽白血病是鸡群中最常见的肿瘤性疾病之一，它不仅会造成病禽的死亡和淘汰，还会引起鸡群生产性能下降、生长迟缓、免疫抑制等现象^[1]。近年来该病所带来的损失也趋于严重。广东省作为我国的养禽大省，有多个优质的黄羽肉鸡地方品系，而AL的防控和净化已是十分迫切的生产课题。

目前,应用于ALV的检测方法包括病毒分离、ELISA、间接免疫荧光(IFA)等^[13-15],这些方法各有其优缺点。在临床生产上针对鸡群AL的流行病学调查和净化,商品化的ELISA检测试剂盒由于其快速、简便、可大批量检测的特点具有不可替代的优势。因为种蛋具有便于收集保存和不易污染的特点,还有可用于病毒分离鉴定等优点^[8]。使用蛋清ALV抗原ELISA检测结果判断净化鸡群中个体ALV的感染状态,目前已在国内ALV净化检测和流行病学调查中被广泛应用。但国内外对ALV蛋清样品病毒分离方面的报道较少,笔者曾对蛋清样品进行病毒分离发现有相当比例的蛋清ELISA阳性样品其实是由内源性病毒引起的^[9]。但蛋清ALV抗原ELISA检测为阳性的鸡是否全部为外源性ALV病毒血症阳性,这个问题值得研究,尤其是对内源性病毒表达不一的各个黄羽肉种鸡品系。

病毒分离鉴定是检测ALV最有效、可靠的技术,常用于病毒分离的细胞有C/O表型的CEF细胞^[16]和源于EV-0系胚胎的DF-1细胞系^[17],其中CEF细胞对所有的内源性和外源性ALV均易感,而DF-1细胞系能够抗内源性ALV感染,而对所有外源性ALV易感。本研究通过比较蛋清样品对应母鸡的同一份血浆分别在CEF和DF-1不同细胞的病毒分离结果,发现蛋清样品抗原ELISA检测S/P越高,其对应母

鸡的血浆样品在2种细胞上的病毒分离率也越高。S/P在2.0以上的蛋清样品其对应母鸡的血浆样品在CEF和DF-1细胞上病毒分离全部为阳性,而S/P低于2.0的蛋清样品对应母鸡的血浆样品在CEF和DF-1细胞上的病毒分离有差异。特别有趣的是S/P小于0.2的蛋清样品,参照ALV抗原ELISA检测试剂盒标准该蛋清对应的母鸡应该被判为阴性,但這些蛋清ELISA阴性鸡的对应血浆样品仍有26.3%(5/19)病毒分离为外源性ALV(CEF⁺DF-1⁺)感染,有15.8%(3/19)检测出内源性ALV(CEF⁺DF-1⁻),尤其值得注意的是,蛋清S/P低于0.1的母鸡其对应血浆样品中也有少数分别分离出了内源性和外源性ALV。对2种细胞病毒分离率进行回归线性分析,结果显示两者之间的相关系数为0.9393,表明检测结果高度相关,检测结果准确。王明月等^[8]从蛋清或泄殖腔棉拭子检测值小于0.2的鸡只中通过病毒分离的方法检测到有10%外源性ALV,这与本研究结果基本一致,充分说明了单独使用蛋清抗原ELISA方法可能会对净化检测结果造成一定程度的“漏检”。

本研究还对来自不同区间的7份CEF⁺DF-1⁻和1份阴性对照的CEF细胞沉淀以及13份CEF⁺DF-1⁺的DF-1细胞沉淀进行ALV亚群鉴定,结果显示7份CEF细胞沉淀中有6份为内源性ALV-E,1份为ALV-J(来自0.2≤S/P<0.5区间),另13份DF-1细胞沉淀全部为ALV-J,这与徐海鹏等^[3]报道的能够从种蛋中分离出内源性ALV结果相一致。相对于血浆病毒分离结果,蛋清S/P小于0.5的阳性结果可能造成一定比例的“误判”。这一结果对于净化初期来说似乎是可以接受的代价——即“宁可错杀、不可放过”,但是对于净化后期、尤其是进行净化评估验收或达标检测时,这种仅基于蛋清ELISA的“误判”可能会给净化实施单位造成“不公”,而应该用更合理的方法或者建立“复检机制”。而对于7份CEF⁺DF-1⁻中的1份ALV-J PCR阳性结果,可能是由不同方法的敏感性差异造成的。

此外,本研究还发现S/P在1.0~2.0之间的蛋清样品对应血浆样品病毒分离中分别有11.1%(1/9)和14.3%(1/7)的样品为阴性(CEF⁻DF-1⁻),究其原因,可能是由具有p27抗原表达但无复制能力的内源性ALV片段(如ev3位点)引起的。研究结果表明:正是由于ALV的感染和排毒时间的不可预测性以及各种检测方法的固有敏感性和特异性差异,无

http://xuebao.scau.edu.cn

论是蛋清抗原 ELISA 检测还是经典的病毒分离法,单独使用 1 种检测方法,均不能 1 次完全检测出外源性 ALV 阳性鸡,故本研究也进一步提示在进行 ALV 的净化过程中需要不同方法组合的多次检测,甚至是多个世代才能更有效地完成 ALV 的净化工作. 本研究结果表明该黄羽肉种鸡育种核心群不仅同时存在缺陷的内源性 ALV 和完整的具有完全复制能力的内源性 ALV,而且也存在需要净化的外源性 ALV. 因此无论是从蛋清 p27 阳性率,还是外源性 ALV 的阳性率,均已经超过拟定的种禽健康标准,该黄羽肉种鸡育种核心群应尽快启动禽白血病的净化.

本研究还分离出 3 株病毒 ALV-J 分别命名为 GD1401J、GD1402J 和 GD1403J,对其 *gp85* 基因进行序列分析后发现,3 个分离株之间的核苷酸相似性高达 98.8% ~ 99.8%. 与国内外参考毒株的 *gp85* 基因进行比较发现,3 个分离株与安徽分离株 AHaQ02 相似性最高,同时与 J 亚群原型株 HPRS103 位于同一个大的进化分支上. 有趣的是,历经多年的演变,该种鸡群分离株的 *gp85* 基因与 J 亚群原型株 HPRS103 相似性仍高达 97.7% ~ 98.1%,说明他们可能来自共同的原始毒株,这些毒株的来源仍需进一步的追溯.

致谢: 本试验是与人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室、广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室共同完成.

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 (Pt 4): 801-807.
- [2] 王鑫,赵鹏,崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病毒新亚群的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28 (6): 609-614.
- [3] 徐海鹏,孟凡峰,董宣,等. 种蛋中内源性禽白血病毒病的检测和鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (8): 1317-1323.
- [4] 高玉龙,邵华斌,罗青平,等. 2009 年我国部分地区禽白血病毒分子流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32 (1): 32-35.
- [5] GAO Y L, YUN B, QIN L, et al. Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J in layer flocks in China

[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50 (3): 953-960.

- [6] LI Y H, LIU X M, LIU H X, et al. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of two avian leukosis virus subgroup J strains associated with hemangioma and myeloid leukosis [J]. Vet Microbiol, 2013, 166 (3/4): 356-364.
- [7] 崔治中,孙淑红,赵鹏,等. 对种鸡场禽白血病毒净化方案的建议[J]. 中国家禽, 2014, 36 (1): 3-6.
- [8] 王明月,窦文文,陈立坤,等. 不同组织样品或检测方法对 ALV 检测结果的影响[J]. 中国兽医学报, 2013, 33 (5): 659-663.
- [9] 郝建勇,徐海雯,秦建如,等. 蛋清样品用于禽白血病毒分离的效果评估[J]. 中国家禽, 2014, 36 (16): 21-25.
- [10] RAJABZADEH M, DADRAS H, MOHAMMADI A. Detection of avian leukosis virus subgroups in albumen of commercial and native fowl eggs using RT-PCR in Iran [J]. Trop Anim Health Prod, 2010, 42 (8): 1829-1836.
- [11] LAI H Z, ZHANG H N, NING Z Y, 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.
- [12] LI L J, ZENG X W, HUA Y P, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein gp85 of avian leukosis virus subgroup J wild-bird isolates from Northeast China [J]. Arch Virol, 2014, 159 (7): 1821-1826.
- [13] QIU Y, LI X, FU L, et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to subgroup A avian leukosis virus [J]. Vet Comp Oncol, 2014, 12 (1): 47-51.
- [14] YUN B L, LI D L, ZHU H B, et al. Development of an antigen-capture ELISA for the detection of avian leukosis virus p27 antigen [J]. J Virol Methods, 2013, 187 (2): 278-283.
- [15] 冯敏,谭利强,代曼曼,等. 种禽场 A 亚群禽白血病毒病原学调查及分离株遗传进化分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 4 (35): 11-15.
- [16] ZHANG H M, BACON L D, FADLY A M. Development of an endogenous virus-free line of chickens susceptible to all subgroups of avian leukosis virus [J]. Avian Dis, 2008, 52 (3): 412-418.
- [17] SCHAEFER-KLEIN J, GIVOL I, BARSOV E V, et al. The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors [J]. Virology, 1998, 248 (2): 305-311.

【责任编辑 柴 焰】