

肉鸡及其鸡胚中 CAV 和 ALV 的 PCR 检测^{*}

王自然¹, 孙 晴^{1**}, 李同树²

(1. 山东省临沂师范学院农林学院, 临沂 276005; 2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018)

摘 要: 应用 PCR 技术对山东省 3 个中小型 AA 肉种鸡场的鸡胚、1 日龄雏鸡和子代肉鸡 CAV 和 ALV 的感染情况进行了检测。用相同的方法直接采集样品的不同组织提取 2 种病毒 DNA, 进行 PCR 扩增及 PCR 产物的克隆和序列测定。结果表明: 被检的 3 个肉种鸡场均有这 2 种病毒的感染, 其中 CAV 的阳性率 24.22%, ALV 的阳性率 17.56%, 二者共感染的阳性率 8.89%。感染鸡各组织中病毒含量也有差异, CAV 以脾脏最多, ALV 以肾脏最多。对肝脏进行细菌分离培养, 并对 40 日龄商品肉鸡进行 ND 血凝抑制 (HI) 抗体效价检测, 发现大肠杆菌等细菌感染阳性率较高, ND - HI 抗体效价显著偏低。说明该地区肉种鸡场和商品鸡场均存在严重的 CAV 和 ALV 感染以及与细菌性疾病的共感染, 并导致鸡只的机体免疫力下降。

关键词: 肉鸡; 鸡传染性贫血病毒; 禽白血病毒; 共感染; 抗体

中图分类号: S852.65; S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2007)05-0556-05

PCR Detection of CAV and ALV in the Broiler Chicks and Embryonic Chickens

WANG Zi-ran¹, SUN Qing¹, LI Tong-shu²

(1. College of Agriculture and Forestry, Linyi Normal University of Shandong Province, Linyi 276005, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai an 271018, China)

Abstract: CAV (chicken infectious anemia virus) and ALV (avian leukosis virus) from embryonic chickens, one-day chickens and commercial chickens collected from 3 different AA broiler breeder farms of Shandong province were detected by PCR. DNA of the two viruses from different organs were extracted, amplified and then evaluated by PCR, and cloned plasmid was sequenced with the same way. The results showed that CAV and ALV were proved to be positive in the three farms investigated, and the positive ratio of CAV and ALV were 24.22% and 17.56% respectively. The co-infection ratio of ALV and CLV was 8.89%. Positive ratio differs in different organs, and the highest positive ratio of CAV and ALV appeared in spleen and kidney respectively. Meanwhile, we also isolated and identified pathogens from the liver of broilers. and at the same time, ND - HI test was used to detect valence of antibody to 40 d commercial chicken, it was showed that the infection ratio of *E. coli* was the highest and the valence of HI was lower. The above results demonstrated that CAV and ALV as well as some bacteria co-infected in broiler breeder and commercial chickens.

Key words: broiler chicken; chicken infectious anemia virus; avian leukosis virus; co-infection; antibody

基金项目: 山东省重点农业科技成果推广项目 (SDGP-2004-54-0)

作者简介: 王自然 (1959-), 男, 副教授, 主要从事动物微生物教学与研究。

收稿日期: 2007-01-20 **修回日期:** 2007-05-16

**** 通讯作者**

鸡传染性贫血病 (Chicken infectious anemia CIA) 是由鸡传染性贫血病毒 (Chicken infectious anemia virus CAV) 引起的以鸡再生障碍性贫血和淋巴组织萎缩为主要特征的免疫抑制性疾病,严重影响雏鸡的生长发育和免疫反应;禽白血病 (Avian Leukosis AL) 是由禽白血病病毒 (Avian leukosis virus ALV) 引起的一种以免疫抑制、生长抑制和髓细胞癌变为特点的传染性致骨髓细胞瘤疾病或成髓性白血病。CAV 和 ALV 2 种病毒均能通过种蛋垂直传播,又可在鸡群内水平传播。感染的肉用种鸡表现消瘦、鸡冠苍白、生长发育不良,其产蛋率、受精率和孵化率明显下降^[1-2],而且还可引起免疫抑制。二者一旦合并和继发其他病毒和细菌、真菌的感染则严重影响养鸡生产^[3-5]。山东省是养鸡大省,近几年来鸡群中 CIA 和 AL 流行比较严重。据报道,通过 ELISA 抗体检测肉种鸡和商品鸡发现,山东省各地区均存在 CAV 和 ALV 感染,不同地区差别较大,所检鸡群的 CAV 和 ALV 抗体平均阳性率分别为 83.2% 和 66.7%^[6-9]。但迄今为止,对鸡胚和 1 日龄弱雏很少见报道。我们应用 PCR 技术对来源于山东省 3 个感染该病毒的中小型规模化肉种鸡场的死胚、1 日龄雏鸡和 40 日龄子代商品肉鸡进行了检测,以了解 2 种病毒在鸡胚和雏鸡以及在子代鸡商品中的动态分布,以期对诊断和流行病学调查奠定基础,为肉种鸡场从源头净化疫病提供理论依据,从而最大限度减少经济损失。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒与受体菌 CAV 病毒 Cux-1 标准株和 ALV 病毒 BAI-A 株的阳性模板由山东农业大学动物科学学院崔治中教授提供。受体菌 TGI 由山东省临沂师范学院农林学院动物预防医学实验室保存。

1.1.2 临床检测样品 来源于山东省 3 个不同 AA 肉种鸡场同一父母代的正常鸡胚、死胚各 30 枚,1 日龄健康雏鸡、弱雏各 30 只以及 40 日龄商品子代肉鸡。

1.1.3 仪器和试剂 PCR 仪 (Eppendorf 德国);电泳仪、凝胶成像仪 (Biorad, 意大利);DL2000 Marker、TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL)、dNTP、MgCl₂、10 倍 buffer、pMD18-T Vector、EcoR、Sal 均购于

大连 TaKaRa 公司。Gel Extraction Kit (OMEGA, biotek) 购于上海英骏生物公司。新城疫标准抗原和阳性血清购于中国兽药监察所。其他相关试剂均为国产分析纯。

1.1.4 引物合成 根据 GenBank 收录的 CAV、ALV 基因核苷酸序列,用软件 Oligo 6.0 设计 2 对引物。CAV-F: CCG GAC GGG TCT AAA TCA (1 234 ~ 1 251),CAV-R: TCT CGC CTT GTG GTG GTT (1 843 ~ 1 860),预期扩增的片段为 627 bp;ALV-F: CCC GTG GAA TTC ATG GCT GTA GTG ATT AAG,ALV-R: CAT ACT CGA GGG CTG GAT AGC AGA CTA CAT,预期扩增的片段为 762 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的细菌分离培养 分别取待检鸡胚、雏鸡和 40 日龄的商品肉子鸡的肝脏接种在普通营养培养基、麦糠凯培养基和支原体培养基上,按不同细菌培养要求进行培养。

1.2.2 病毒 DNA 的提取 采用 SDS-蛋白酶 K-苯酚提取法^[8]。取少量肝脏、胸腺、骨髓、脾脏、法氏囊、肾脏等供检组织分别加入 0.5 mL 的组织抽提缓冲液,研磨离心后,取上清液。加入蛋白酶 K (300 mg/L) 和 SDS (0.5%),56℃ 消化 2 h,再用苯酚、氯仿抽提,上清液用乙醇沉淀,沉淀溶于 TE 缓冲液中,-20℃ 保存备用。

1.2.3 PCR 检测 50 μL PCR 反应体系:10 倍 buffer 5 μL,10 mmol/L 的 dNTP 4 μL,5 U/μL Taq DNA 酶 0.5 μL,25 μmol/L 上、下游引物各 1.5 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 36.5 μL。PCR 反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 2 min,共进行 28 个循环;72℃ 10 min。然后取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.2.4 PCR 产物的克隆和序列测定 为确定 PCR 产物的特异性,按 DNA 回收试剂盒的方法回收 PCR 扩增产物,并将回收的 PCR 产物分别与 pMD18-T 载体连接,转化感受态大肠杆菌 TGI,并挑选白色菌落,对抽提的质粒用 EcoR 和 Sal 2 种限制性内切酶鉴定阳性克隆。随机挑取 3 份病料的 CAV、ALV PCR 扩增产物的阳性克隆,进行序列测定与分析^[9-11]。

1.2.5 样品的检测 取样品中肝脏、脾脏、胸腺、法氏囊、骨髓、肾脏,分别提取模板 DNA,进行

PCR 检测。

1.2.6 商品鸡细菌分离和血清 ND 抗体检测 应用血凝抑制试验(HI)测定 40 日龄商品鸡血清中新城疫血凝抑制抗体效价,并进行细菌分离,以检测鸡群中细菌感染情况。

1.2.7 数据处理 对鸡胚、雏鸡和 40 日龄子代商品鸡中 CAV、ALV 感染及 CAV 和 ALV 共同感染的阳性数分别进行方差分析,以确定差异的显著性。

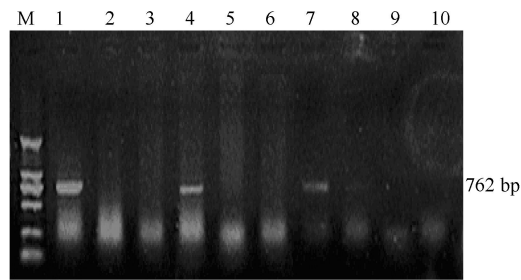
2 结果与分析

2.1 样品中 CAV、ALV 感染及 CAV 和 ALV 共同感染的阳性检出率

从表 1 中可以看出,CAV、ALV 感染以及二者共感染的阳性检出率 40 日龄子代商品鸡 > 弱雏 > 死胚 > 健康雏 > 正常胚。说明 2 种病毒既能通过种蛋垂直传播,又可在鸡群内水平传播,因而对子代商品鸡造成的危害较重。PCR 电泳结果见图 1~4。

表 1 不同样品中 CAV、ALV 感染及 CAV 和 ALV 共同感染的阳性检测率

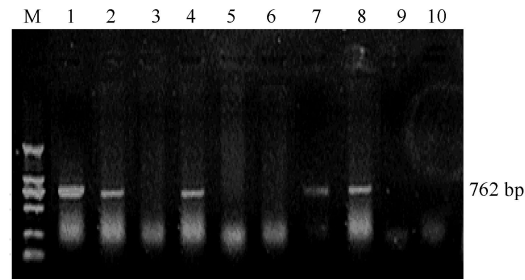
Table 1. Positive / Co-infection ratio of ALV and CLV in different samples						%
毒株 Pathogeny	正常胚 Normal embryo	死胚 Dead embryo	健康雏 Healthy chicken	弱雏 Weak chicken	40 d 商品鸡 Commercial chicken	平均阳性率 Average positive rate
CAV	11.11	23.33	14.44	28.89	43.33	24.22
ALV	6.67	18.89	8.89	23.33	30.00	17.56
CAV + ALV	2.22	8.89	3.33	11.11	18.89	8.89



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 10. 阴性对照 Negative control; 2~5. 正常胚 Normal embryo; 6~9. 健康雏 Healthy chicken

图 1 部分正常胚和健康雏的 ALV 扩增结果

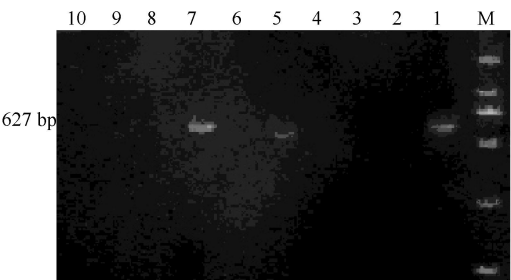
Fig. 1. PCR amplification result of ALV detected in parts of the normal embryos and healthy chickens



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 10. 阴性对照 Negative control; 2~5. 死胚 Death embryo; 6~9. 弱雏 Weak chicken

图 2 部分死胚和弱雏的 ALV 扩增结果

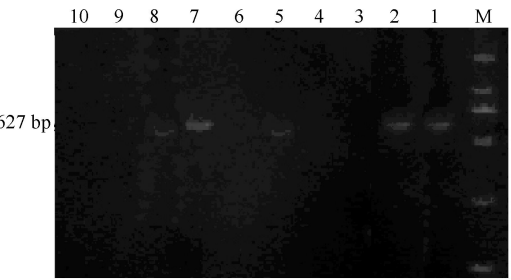
Fig. 2. PCR amplification result of ALV detected in parts of the death embryo and weak chickens



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 10. 阴性对照 Negative control; 2~5. 正常胚 Normal embryo; 6~9. 健康雏 Healthy chicken

图 3 部分正常胚和健康雏的 CAV 扩增结果

Fig. 3. PCR amplification result of CAV detected in parts of the normal embryo and healthy chickens



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 10. 阴性对照 Negative control; 2~5. 死胚 Death embryo; 6~9. 弱雏 Weak chicken

图 4 部分死胚和弱雏的 CAV 扩增结果

Fig. 4. PCR amplification result of CAV detected in parts of the death embryo and weak chickens

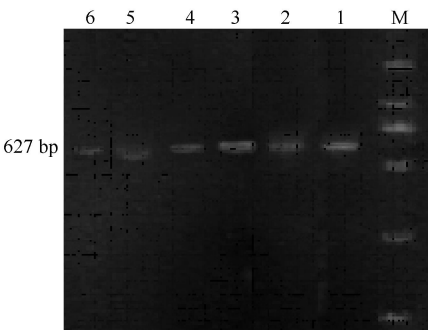
2.2 不同组织样品中 CAV 和 ALV 的检测结果

不同组织中 CAV 和 ALV 的阳性检出率结果见表 2。取不同组织阳性模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳结果见图 5、图 6。以肝脏、脾脏、胸

腺、骨髓、法氏囊、肾脏等各组织样品为模板均能扩增出特异性条带,扩增条带的亮度可反映不同组织含量的高低^[11]。其中 CAV 以脾脏的最亮,ALV 以肾脏最亮。

表 2 不同组织中 CAV 和 ALV 的阳性检测结果

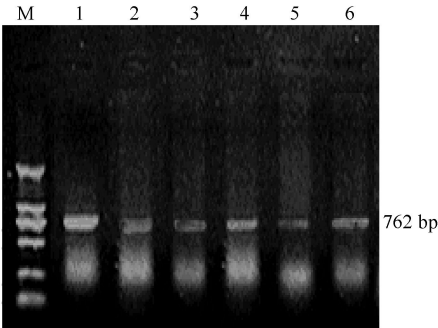
Table 2. Positive ratio of ALV and CLV in different tissues						%
病原 Pathogeny	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	胸腺 Thymus	骨髓 Marrow	法氏囊 Bursa fabricii	肾脏 Kidney
CAV	67.78	83.33	21.11	47.78	17.78	57.78
ALV	47.78	51.11	12.22	24.44	10.00	66.67



M. DL2000 Marker; 1. 肾脏 Kidney; 2. 肝脏 Liver; 3. 脾脏 Spleen; 4. 胸腺 Thymus; 5. 骨髓 Marrow; 6. 法氏囊 Bursa fabricii

图 5 不同组织中 CAV 的扩增结果

Fig. 5. PCR amplification result of CAV detected in parts of different tissues



M. DL2000 Marker; 1. 肾脏 Kidney; 2. 肝脏 Liver; 3. 脾脏 Spleen; 4. 胸腺 Thymus; 5. 骨髓 Marrow; 6. 法氏囊 Bursa fabricii

图 6 不同组织中 ALV 的扩增结果

Fig. 6. PCR amplification result of ALV detected in parts of different tissues

2.3 PCR 产物的克隆和序列测定

CAV 和 ALV 的 PCR 产物经克隆、测序,结果 3 个 CAV 扩增产物的序列之间及 3 个 ALV 扩增产物的序列之间同源性均非常高,为 97.2 % ~ 99.3 %。CAV 扩增产物的序列与已发表的 CAV 相关区域的核苷酸序列同源性均高于 96 %,ALV

扩增产物的序列与已发表的禽白血病群特异性抗原 p27 基因序列同源性均高于 95 %、表明检测到的病原为 CAV 和 ALV。

2.4 试验数据统计处理结果

商品肉子鸡、死胚和 1 日龄弱雏 ALV 和 CAV 阳性率及二者共感染的阳性率明显高于正常胚和 1 日龄健康雏鸡 ALV 和 CIAV 阳性率及其共感染的阳性率,二者差异极显著 ($P < 0.01$)。说明 2 种病毒也可在鸡群内水平传播。

2.5 细菌分离的平均阳性率结果

经细菌培养分离鉴定,大肠杆菌 (*E. coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*) 和霉形体 (*mycoplasma*) 感染的阳性率,正常胚是 5.55 %、死胚是 34.44 %、健康雏是 2.22 %、弱雏是 41.11 %、40 日龄子代商品鸡是 68.89 %。说明 CAV 和 ALV 感染的种鸡场的鸡胚、雏鸡和子代商品肉鸡感染细菌性疾病的阳性率较高。

2.6 40 日龄商品肉鸡群血清 ND - HI 效价检测结果

由表 3 可以看出,CAV、ALV 和 CAV + ALV 感染鸡群 ND 免疫后 15 d 内 ND - HI 抗体效价 log2 平均值为 3.2 ~ 4.5,比正常 (ND - HI 效价值约 7 ~ 9)^[12]约降低 4 个抗体滴度,而 2 种病毒混感时,ND - HI 抗体效价最低。说明免疫抑制性传染病的存在是构成该地区鸡群免疫失败、疫病流行的主要因素之一。

表 3 40 日龄商品肉鸡血清 ND - HI 抗体效价检测结果
Table 3. Test result of the ND - HI antibody titres in 40 d commercial chicken

病原 Pathogeny	ND 免疫后时间/d Time post immunization	HI 平均滴度 log 2 HI titer
CAV	15	4.1
ALV	15	4.5
CAV + ALV	15	3.2

3 讨 论

1) 本试验建立的 PCR 检测技术敏感性和特异性强,可用于临床感染病毒的不同组织的检测。

对这 2 种病毒的检测,前人大都采用免疫学的方法,这对种鸡和商品鸡是适用的;应用 PCR 技术检测也大多是针对成年鸡,而且通过细胞培养提取核酸,ALV 是提取 RNA,条件苛刻,操作繁琐。本试验是直接从组织中提取病毒 DNA,其特异性和敏感性均大于其他抗原抗体反应,且省时省力,适合鸡胚和雏鸡的检测。同时还发现对感染病料中肝脏、脾脏、胸腺、肾脏、法氏囊、骨髓等不同样品进行检测时,均可扩增出相应 DNA 片段,但敏感性不同,这说明病毒在此部位的定位不同^[13]。

2) 鸡传染性贫血病和禽白血病是 2 种免疫抑制病,病毒感染机体可引起胸腺、法氏囊及其他淋巴细胞严重缺失,降低机体的免疫功能。从本试验结果可以看出,死胚和弱雏中明显存在 CAV 感染、ALV 感染和二者的混合感染以及继发性细菌感染。Yuasa 报道,该病毒具有较强的年龄抵抗力,随着年龄的增加,雏鸡对 CAV 的抵抗力加强;但若 1 日龄时感染了,其免疫抑制作用将不能很快恢复,以致于影响 IBD、MD、ND 等疫苗的免疫效果。据刘岳龙等^[14]报道,在临床上出现使用 ND 疫苗后 HI 滴度不高,大肠杆菌病、沙门氏菌病和支原体病日益严重且用药无效,传染性法氏囊病和肾型传染性支气管炎引起较高死亡率等一系列现象,这些现象与该病毒的免疫抑制作用有关,但确切的关系还需要进一步探讨。

3) 这 2 种病毒既能通过种蛋垂直传播,又可在鸡群内水平传播。从试验结果中不难看出,在鸡胚、雏鸡和商品子鸡中都存在 2 种病毒的感染,其阳性率 40 日龄商品肉鸡 > 弱雏 > 死胚 > 健康雏 > 正常胚。这说明该病毒可通过种蛋垂直传播给雏鸡,并通过与感染鸡接触或通过环境传播给未感染的鸡。据报道,垂直感染的商品代肉鸡,其生长速度显著低于没有垂直感染的同批对照鸡^[15]。所以做好种蛋、鸡胚和 1 日龄雏鸡的检测工作,对于种鸡场净化该类疫病至关重要。

4) 上述研究结果表明该地区肉种鸡场和商品鸡场免疫抑制性传染病的感染率较高,影响了鸡体正常的免疫应答,增加了对其他病源的易感

性,使鸡群新城疫 HI 抗体效价明显降低,细菌感染阳性率高达 68.88%,使鸡群死淘率增高。建议该地区加强对种鸡场的免疫抑制病的检测和控制。

参考文献:

- [1] YUASA N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks[J]. Avian Dis, 1979, 23: 366-385.
- [2] FAIRFULL R W, GARWOOD V A, SPENCER J L, et al. The effects of geographical area, rearing method, caging density and lymphoid leukosis infection on adult performance in egg stocks, of chicken [J]. Poultry Science, 1983, 62: 2360-2370.
- [3] 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.
- [4] CALNEK B W, BARNES H J, BEAND C W, et al. Diseases of Poultry [M]. 10 th ed. Iowa: Iowa State University Press Amen, 1997: 736-756.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 870-885.
- [6] NOTEBPRN. M H M, VERSCHUEREN C A J, ROOZLAAR D J V, et al. Detection of chicken anemia virus by DNA hybridization and polymerase chain reaction [J]. Avian Pathology, 1992, 21: 107-118.
- [7] TODD D, CREELAN J L, MCNULTY M S, et al. Dot bolt hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe[J]. Clinical Micro, 1991, 29(5): 933-939.
- [8] 刘泽文, 邵华斌, 杨峻, 等. 应用 PCR 方法检测鸡传染性贫血病毒[J]. 湖北畜牧兽医, 2004(4): 30-31.
- [9] SMITH L M, BROWN S R, HOWES K. Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus[J]. Virus Research, 1998, 54: 87-98.
- [10] 乔彩霞, 关云涛, 陈洪岩, 等. 禽白血病劳斯肉瘤病毒衣壳蛋白 P27 基因的克隆、原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(3): 169-172.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1999: 267-269.
- [12] 吕亚军. 禽免疫抑制性疾病的发生及防制研究进展[J]. 中国禽业导刊, 2002, 19(2): 32-35.
- [13] 张立成, 关云涛, 陈洪岩, 等. 应用 RT-PCR 技术检测禽白血病病毒及其在不同组织中检出结果的比较[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(5): 303-305.
- [14] 刘岳龙, 崔治中, 段玉友. PCR 和斑点杂交检测鸡传染性贫血病毒[J]. 中国兽医学报, 1996, 1(16): 38-41.
- [15] STEDMAN N L, BROWN T P. Body weight suppression in broilers naturally infected with avian leukosis virus subgroup [J]. Avian Dis, 1999, 43(3): 604-610.