

用 PCR 检测肉种鸡的鸡胚、雏鸡和子代肉鸡 CAV 和 ALV

孙 晴¹, 王自然¹, 李同树²

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

摘要: 为了解 CAV 和 ALV 在不同阶段对肉鸡的感染情况, 应用 PCR 方法, 对山东省某 3 个中小型 AA 肉种鸡场的鸡胚、1 日龄雏鸡和子代肉鸡中的 CAV 和 ALV 进行检测, 试验直接采集样品的不同组织提取 DNA, 进行 PCR 扩增及 PCR 产物的克隆和序列测定。结果显示, 被检的 3 个肉种鸡场及商品肉仔鸡均有这两种病毒的感染, 其中 CAV 的阳性率 24.22%; ALV 的阳性率 17.56%, 两者共感染的阳性率 8.89%。而且感染鸡各组织病毒含量也有差异, CAV 以脾脏最多, ALV 以肾脏最多。同时对肝脏进行细菌分离培养, 并对 40 日龄子代商品肉鸡进行 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。由此可见, 鸡胚、雏鸡和子代肉鸡体内存在 CAV、ALV 的感染以及与细菌性疾病的共感染, 造成机体免疫力下降。

关键词: 肉种鸡; 鸡传染性贫血病病毒; 禽白血病毒; 共感染; 抗体

中图分类号: S831.1 文献标识码: A

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

SUN Qing¹, WANG Zi-ran¹, LI Tong-shu²

(1. College of Animal Medicine, Linyi Normal University of Shandong Province, Linyi 276005 China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: CAV (Chicken infectious anemia Virus) and ALV (Avian leukosis virus) were detected by PCR from embryonic chickens, one-day chickens and commercial chickens collected from different 3 AA broiler breeding farms of Shandong Province to see infections of CAV and ALV in broilers in different stages. DNAs from different organs were extracted, amplified, and evaluated by PCR, and the cloned plasmid was sequenced. 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%. The co-infection ratio of ALV and CLV was 8.89%. The positive ratios differ in different organs, and the highest positive ratios of CAV and ALV were observed in spleen and kidney, respectively. The pathogens from the liver of the broilers were isolated and identified. At the same time, ND-HI test was used to detect the valence of antibody in 40 d commercial chicken, it was showed that the infection ratio of *E. coil* was the highest, the valence of HI was lower. The

收稿日期: 2007-03-15

基金项目: 山东省财政支持重点农业科技成果推广项目 (SDGP-2004-54-0)

作者简介: 孙晴 (1969-), 女, 副教授, 从事动物预防医学教学与研究。

above results demonstrated that the infection of CAV and ALV and the co-infection of other bacteria weaken the immunity of embryonic chickens, 1d chickens and commercial chickens.

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

鸡传染性贫血病(Chicken infectious anemia, CIA)是由鸡贫血病毒(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。这两种病毒既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,一旦合并和继发其它病毒和细菌、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 ALV 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,山东省各个地区均存在 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%^[5-9],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,以了解该病毒在鸡胚和雏鸡以及在商品仔鸡中的动态分布,为该病的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,ALV 病毒 BAI-A 株的阳性模板,均由山东农业大学动物科学学院崔治中教授实验室提供。受体菌为 TG1 由我院动物预防医学实验室保存。

1.1.2 临床检测样品 来源于临沂市 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;40 日龄商品子代肉鸡各 30 只。

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);TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L),dNTP,MgCl₂,10 \times buffer,pMD18-T Vector,EcoR I,Sal I 均购于大连宝生物工程公司;Gel Extraction Kit(OMEGA,bio-tek)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检查所;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 设计两对引物:

CAV-JC-F;GCG GAC GGG TCT AAA TCA(1234-1251)

CAV-JC-R;TCT CGC CTT GTG GTG GTT(1843-1860)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;

引物皆由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

两种病毒在病毒 DNA 的提取、PCR 反应体系、PCR 产物的克隆和序列测定方法上均相同。

1.2.1 样品的细菌分离培养 分别取待检鸡胚、雏鸡和 40 日龄的商品肉仔鸡的肝脏接种在麦糠凯培养基和支原体培养基上,按培养要求进行培养。

1.2.2 病毒 DNA 的提取 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(100 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,25 mmol/L EDTA pH 8.0,5% SDS),研磨离心后,取上清液。于每份样品中加入蛋白酶 K 5 μ L,52 $^{\circ}$ C 消化 24 h,而后加入等体积的 $V_{\text{苯酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}$ (25:24:1)混和液,振荡均匀 1 min。12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一个离心管中,加入 0.5 mL 氯仿,振荡摇匀,12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一个离心管中,加入 1 mL 的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 2 h,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL $\rho=70\%$ 的乙醇漂洗,12 000 r/min 离心 3 min,将上清液弃去,自然干燥后,加入 50 μ L 的 TE 缓冲液。

1.2.3 PCR 检测 50 μ L PCR 反应体系:含 10 \times buffer 5 μ L,10 mmol/L 的 dNTP 4 μ L,5 U/ μ L Taq DNA 酶 0.5 μ L,25 μ mol/L、下游引物各 1.5 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 36.5 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C

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^[8,10] 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 TG1, 并挑选白色菌落, 对抽提的质粒用 EcoRI 和 SalI 两种限制性内切酶鉴定阳性克隆。随机挑取 3 份病料 CAV、ALV 的 PCR 扩增产物的阳性克隆, 进行序列测定与分析。

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。应用 HI 试验测定新城疫血清中抗体效价, 并检查鸡群细菌感染情况。

1.2.6 数据处理 对鸡胚和雏鸡中 CAV 和 ALV 感染及共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 样品检测结果

检测统计结果如表 1, 从表中可看出阳性检出率 40 日龄商品肉鸡 > 弱雏 > 死胚 > 健康雏 > 正常胚。说明两种病毒既能通过种蛋垂直传播, 又可在鸡群内水平传播, 因而对商品代肉鸡造成的危害较重。

表 1 不同样品的阳性检测率
Tab. 1 Positive ratio of different samples %

毒株	正常胚	死胚	健雏	弱雏	40 d 商品鸡	平均阳性率/%
CAV	11.11(10/90)	23.33(21/90)	14.44(13/90)	28.89(26/90)	43.33(39/90)	24.22(109/450)
ALV	6.67(6/90)	18.89(17/90)	8.89(8/90)	23.33(21/90)	30.00(27/90)	17.56(79/450)
CAV + ALV	2.22(2/90)	8.89(8/90)	3.33(3/90)	11.11(10/90)	18.89(17/90)	8.89(40/450)

注: PCR 电泳结果如图 1 ~ 图 4。



图 1 部分正常胚和健康雏的 ALV 扩增结果
Fig. 1 The PCR amplification result of embryos and healthy chickens
2~5 the normal embryo; 6~9 healthy chicken



图 2 部分死胚和弱雏的 ALV 扩增结果
Fig. 2 The PCR amplification result of ALV detected in parts of the normal ALV detected in parts of the death embryo and weak chickens
2~5 the death embryo; 6~9 weak chicken

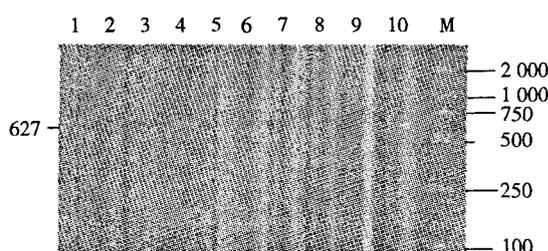


图 3 部分正常胚和健康雏的 CAV 扩增结果
Fig. 3 The PCR amplification result of CAV detected in parts of the norma embryo and healthy chickens
2~5 the norma embryo; 6~9 healthy chicken

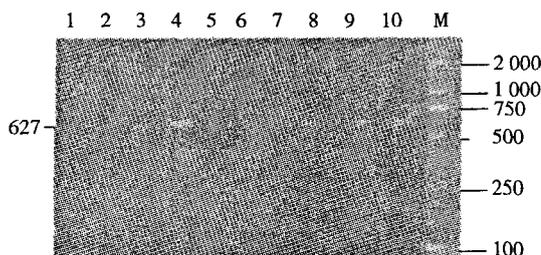


图 4 部分死胚和弱雏的 CAV 扩增结果
Fig. 4 The PCR amplification result of CAV detected in parts of the death embryo and weak chickens
2~5 the death embryo; 6~9 sick chicken

2.2 不同组织样品检测结果

PCR 检测结果显示,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,扩增条带的亮度强弱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。不同组织中 CAV 和 ALV 的阳性率如表 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 5,6。

表 2 不同组织的阳性检测结果
Tab.2 Positive ratio of different tissues

病原	肝脏	脾脏	胸腺	骨髓	法氏囊	肾脏
CAV	67.78(61/90)	83.33(75/90)	21.11(19/90)	47.78(43/90)	17.78(16/90)	57.78(52/90)
ALV	47.78(43/90)	51.11(46/90)	12.22(11/90)	24.44(22/90)	10.00(9/90)	66.67(60/90)

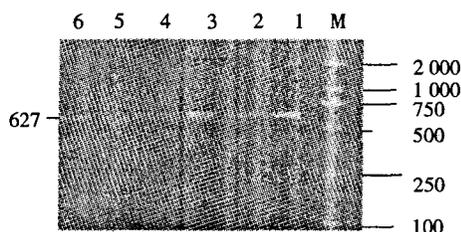


图 5 不同组织中 CAV 的扩增结果

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

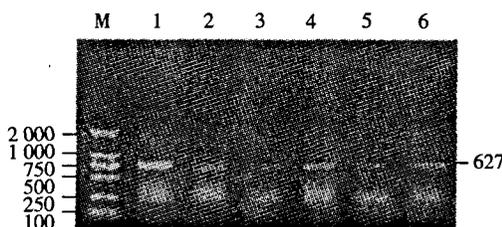


图 6 不同组织中 ALV 的扩增结果

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

注:M. DL2000 marker;1 kidney;2 liver; 3 spleen ; 4 thymus; 5 marrow; 6 bursa fabricii

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,介于 97.2% ~ 99.3% 之间,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%;扩增 ALV 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%。表明建立的 CAV 和 ALV 的 PCR 检测方法可行。

2.4 数据处理结果

统计结果表明,商品肉鸡、死胚和 1 日龄弱雏 ALV 和 CIAV 阳性率及两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,两者差异极显著($P < 0.01$)。

2.5 细菌分离的平均阳性率结果

经培养分离鉴定,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 日龄商品鸡 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 日龄商品肉鸡血清 ND - HI 效价检测结果

由表 3 可见,CAV、ALV 和 CAV + ALV 感染鸡群 ND 免疫后 15 d 内 ND HI 抗体效价 log₂ 平均值在 3 ~ 5 之间,比正常(ND HI 效价值约 7 ~ 9)^[11]约降低 4 个抗体滴度,而两种病毒混感时,ND - H 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

Tab.3 The examinatorial result of the ND - HI antibody titres in 40 d commercial chicken

病原	鸡日龄/d	ND 免疫后/d	HI 平均滴度 log ₂
CAV	40	15	4.1
ALV	40	15	4.5
CAV + ALV	40	15	3.2

3 讨 论

(1)本实验建立的 PCR 方法敏感性特异性强,可用于临床感染不同组织病毒的检测。对这两种病

毒的检测,前人大多用免疫学的方法,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^[12]。

(2)鸡传染性贫血病和禽白血病是两种免疫抑制病。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感染细菌性疾病。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;但若一日龄时感染了,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^[13]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死亡率严重等一系列现象,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和研究。

(3)这两种病毒既能通过种蛋垂直传播,又可在鸡群内水平传播。从试验中不难看出,在鸡胚、雏鸡和商品仔鸡中都存在两种病毒的感染,而且阳性率是40日龄商品肉鸡>弱雏>死胚>健康雏>正常胚。这说明该病毒可先天性地通过母鸡的蛋而传播给雏鸡,并通过与感染鸡接触或从感染的环境中传播给未感染的鸡。有报道表明,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^[14]。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。影响了鸡体对正常免疫所产生的应答,增加了对其他病源的易感性。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: 2 360-2 370.
- [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, Beard C W, et al. Diseases of Poultry (Tenth Edition) [M]. Iowa: Iowa State University Press Ames, 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, Verschuere C A J, Roozelaar 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 blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe [J]. Clinical Micro, 1991, 29(5): 933-939.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 19-22, 55-56, 880-886.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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, 16(1): 38-41.
- [14] 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.