

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.7.02

# SPF 鸡感染网状内皮组织增生症病毒后血清和卵黄的抗体反应相关性比较

黄小洁,陈晓春,刘丹,朱真,侯力丹,李慧姣,李俊平\*,杨承槐\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2017-02-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 07-0006-04 [中图分类号] S852.5

**[摘要]** 为进一步研究采用卵黄抗体检测代替血清抗体检测的可行性,采用已建立的卵黄抗体 ELISA 检测方法,比较同一时期卵黄抗体与血清抗体的相关性。人工感染 23 周龄无特定病原体 (SPF) 鸡,每周采集全血分离血清,每天收集种蛋,ELISA 方法检测血清、种蛋中的 REV 抗体,并进行比较,结果表明:攻毒后第 2 周开始血清抗体和卵黄抗体呈阳性,并达到峰值,之后抗体水平缓慢下降,两者具有相似的消长规律;对同一时期的卵黄抗体和血清抗体 S/P 比值进行统计学比较,  $P$  值小于 0.05,相关系数为 0.931,表明两者差异性不显著,相关性很好;阴阳性符合率比较,阳性符合率为 97.8%,阴性符合率为 100%,总体符合率为 98.4%,阴阳性复合率很高。试验证明,同一时期的卵黄抗体和血清抗体的相关性很好,可用卵黄抗体检测方法代替血清抗体检测,从而为监测 SPF 鸡群感染 REV 提供新的技术手段。

**[关键词]** 网状内皮组织增生症病毒;血清;卵黄;抗体;ELISA;相关性

## Study on the Relationship between Yolk Antibody and Serum Antibody in SPF Chickens Infected with Reticuloendotheliosis Virus

HUANG Xiao-jie, CHEN Xiao-chun, LIU Dan, ZHU Zhen, HOU Li-dan, LI Hui-jiao,

LI Jun-ping\*, YANG Cheng-huai\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: Li Jun-ping, E-mail: lijunping@ivdc.org.cn; Yang Cheng-huai, E-mail: yangchenghuai@ivdc.org.cn

**Abstract:** In order to study the feasibility of using yolk antibody test instead of serum antibody test, the correlation of the yolk and serum antibody in the same period was compared using the established method of ELISA detection of yolk antibody. 23-week old SPF chickens were infected, blood samples were collected and serum was isolated every week, eggs were collected every day, correlation between yolk antibody and serum antibody were compared after test using ELISA. The result showed that the serum antibody and yolk antibody could be tested from the second week after infected and reached the highest level. After that the antibody decreased slowly, so the

作者简介:黄小洁,兽医硕士,从事原材料质量控制工作。

通讯作者:李俊平,E-mail: lijunping@ivdc.org.cn;杨承槐,E-mail: yangchenghuai@ivdc.org.cn

yolk antibody had the similar disciplinarian with the serum antibody. S/P ratio of the yolk and the serum antibody in the same period was compared by statistical method, P was less than 0.05 and the correlation coefficient was 0.931, which indicated that the difference was not significant and the correlation was very good. The positive coincidence rate was 97.5%, the negative coincidence rate was 100%, the overall coincidence rate was 98.4%, the coincidence rate of the positive and the negative was high. Experiment proved the correlation between yolk and serum antibody in the same time was very good, using yolk antibody detection instead of serum antibody was feasible, which could be used to monitor REV of SPF chickens.

**Key words:** REV; serum; yolk; antibody; ELISA; correlation

禽网状内皮组织增生症(Reticuloendotheliosis, RE)是由反转录病毒科网状内皮组织增生症病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)群引起的几种禽类的一群病理综合征。RE 是迄今继鸡白血病(AL)、鸡马立克氏病(MD)之后发现的第 3 种具有传染性的病毒性肿瘤病。REV 不仅能够通过接触水平传播,还能通过鸡胚垂直传播<sup>[1]</sup>。

在国标规定的 19 种 SPF 鸡监测的微生物中,疫苗生产企业主要关注 ALV、REV、REO 等六种蛋传病毒的影响。国标规定,REV 的检测方法是琼脂扩散方法(AGP)和酶联免疫吸附试验(ELISA)方法<sup>[2]</sup>。AGP 的敏感性较低、且需要大量的纯化抗原,因而目前使用较多的是血清抗体 ELISA 方法,并且市场上已有很多商品化的 ELISA 检测试剂盒可供选择。ELISA 方法需要采集血清,而血清采集费时费力,且易引起鸡的应激反应,导致鸡生产性能下降,并且疫苗生产企业在检验血清的获取上也存在很多困难。针对上述问题,本研究采用已建立的卵黄抗体 ELISA 检测方法<sup>[3]</sup>比较了 SPF 鸡中卵黄抗体与血清抗体的相关性,为下一步运用卵黄抗体检测代替血清抗体检测,监测 SPF 鸡群 REV 的感染情况提供数据支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 5 只 16 周龄 SPF 鸡,购自北京梅里亚维通利华实验动物技术有限公司,分成两组,4 只为攻毒组,1 只为对照组,分别饲养于中国兽医药品监察所 SPF 禽隔离器内。

1.1.2 病毒 REV MD-2 株,由中国兽医药品监察所病毒制品检测室分离保存。

1.1.3 试剂 REV ELISA 抗体试剂盒,购自 IDEXX 公司。吐温-20 购自国药集团。

### 1.2 方 法

1.2.1 动物实验 SPF 蛋鸡在 20 周龄陆续开产,23 周龄时产蛋情况稳定,血清 REV 抗体检测为阴性。攻毒组按每只鸡  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> 注射 REV MD-2 株强毒,对照组注射同等剂量的生理盐水。每周采全血分离血清,每天收集种蛋。

1.2.2 血清抗体 ELISA 检测 方法按抗体检测试剂盒说明书进行。

1.2.3 卵黄抗体 ELISA 检测 按照已优化的卵黄抗体处理方法<sup>[3]</sup>直接提取卵黄抗体,并稀释至 300 倍,用含 0.05% 吐温-20 蒸馏水洗涤,其他操作按 ELISA 试剂盒的说明进行。

1.2.4 相关性比较 将卵黄抗体检测和血清抗体检测的 OD 值分别按试剂盒说明书要求的方法换算成 S/P 比值,比较两者相关性。

## 2 结 果

2.1 样品收集结果 本次实验抗体监测持续 10 周,每周采集一次血清,每天收集鸡蛋。5 只鸡共采血清样品 50 份,卵黄样品 64 份。其中,攻毒组采集血清样品 40 份,卵黄样品 49 份;对照组采集血清样品 10 份,卵黄样品 15 份。

2.2 SPF 鸡接种 REV 强毒后血清抗体反应动态 攻毒组在 23 周龄攻毒,攻毒后第 1 周血清中 REV 抗体阴性,第 2 周开始产生抗体,并达到峰值,之后

抗体水平呈缓慢下降的趋势(图 1)。而阴性对照组血清抗体的 S/P 比值均小于 0.5,检测结果为阴性,表明对照鸡没有受 REV 感染。

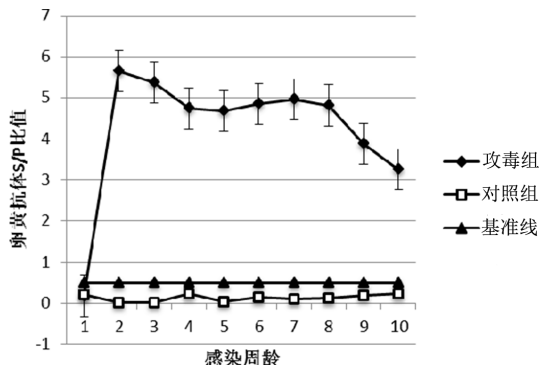


图 1 SPF 鸡血清抗体反应动态

Fig 1 Response dynamics of SPF chickens serum antibody response

2.3 SPF 鸡接种 REV 强毒后卵黄抗体反应动态 攻毒组共收集鸡蛋样品 40 份,对照组样品 15 份。同血清抗体相似,感染后第 1 周卵黄 REV 抗体阴性(图 2),第 2 周开始 REV 抗体呈阳性,且达到峰值,之后抗体水平呈现缓慢下降趋势。对照组的卵黄抗体 S/P 比值均低于 0.5,同血清抗体检测结果一致。

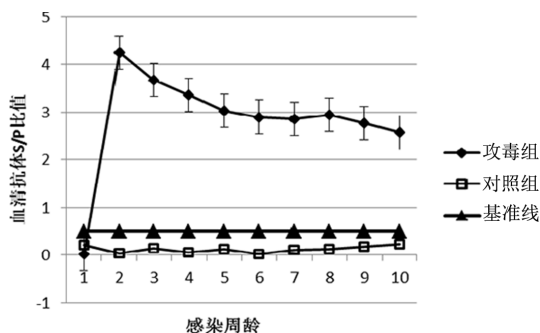


图 2 SPF 鸡卵黄抗体反应动态

Fig 2 Response dynamics of SPF chickens yolk antibody

2.4 血清抗体与卵黄抗体检测结果比较 运用 SPSS13.0 软件进行分析,同一时期的血清和卵黄抗体检测结果差异不显著( $P>0.05$ ),卵黄抗体和血清抗体的 S/P 比值相关系数为 0.931(图 3),表明卵黄抗体和血清抗体的 S/P 比值相关性很好。

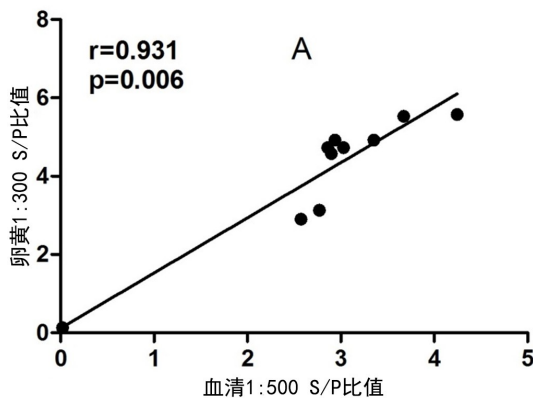


图 3 同一时期的卵黄抗体和血清抗体相关性分析 Fig 3 Comparison of relationship between yolk and serum antibody in the same time

2.5 SPF 鸡卵黄抗体与血清抗体的吻合率比较 攻毒后第 1 周所有卵黄、血清均为 REV 抗体阴性,第 2 周以后所有血清样品均为阳性,卵黄样品有 1 份为阴性,其他 24 份为阳性(表 1)。卵黄与血清的阳性符合率为  $44/(44+1) = 97.8\%$ ,阴性符合率为  $19/19 = 100\%$ ,总体符合率为  $63/(63+1) = 98.4\%$ 。

### 3 讨论

REV 是禽类重要的致瘤性和免疫性抑制病之一,是威胁养禽业发展的一种重要蛋传疾病。并且由于该病的垂直传播性,如若生产弱毒疫苗的一批鸡胚中有个别污染了 REV,就会使整批疫苗污染病毒,导致给出壳雏鸡接种时,人为造成全群感染,导致污染外源病毒的疫苗报废和发病鸡群的淘汰,造成巨大的经济损失,引发各种纠纷。因此,SPF 蛋的质量尤其重要,但生产上都是采用检测 SPF 鸡血清的抗体水平。

本研究运用已建立的卵黄抗体 ELISA 检测方法,对人工感染的 SPF 蛋鸡的血清和卵黄进行抗体检测。结果显示,感染后卵黄和血清抗体在同一时间段产生,即都在攻毒后的第二周产生,并达到峰值。Vicco V Bülow<sup>[4]</sup>在 1977 年的实验中证明 21 日龄的小鸡接种 REV 强毒后在 21 日龄时产生抗体,并达到峰值。这个差异很可能与 REV 病毒的特性有关系,该病毒主要感染小日龄鸡,鸡龄越大免疫机能越完善,大日龄的鸡比小日龄的鸡在接种后能更

表 1 SPF 鸡卵黄抗体与血清抗体的符合率比较

Tab 1 Comparison of the coincidence rate between egg yolk antibody and serum antibody of SPF chickens

感染周龄	卵黄抗体与血清抗体一致的卵黄样品 yolk antibody is consistent well with serum			卵黄抗体与血清抗体不一致的卵黄样品 yolk antibody is on the contrary to serum antibody		
	血清抗体、卵黄抗体均为阳性 Positive for serum antibody and yolk antibody	血清抗体、卵黄抗体均阴性 Negative for serum antibody and yolk antibody	小计 Total	血清抗体阴性、卵黄抗体阳性 Negative for serum antibody and positive for yolk antibody	血清抗体阳性、卵黄抗体阴性 Positive for serum antibody and negative for yolk antibody	小计 Total
1	0	5	5	0	0	0
2	5	2	7	0	0	0
3	6	2	8	0	0	0
4	6	2	8	0	1	1
5	8	1	9	0	0	0
6	1	1	2	0	0	0
7	6	2	8	0	0	0
8	6	1	7	0	0	0
9	2	2	4	0	0	0
10	4	1	5	0	0	0
合计	44	19	63	0	1	1

快产生抗体。之后抗体随着周龄的增加基本处于缓慢下降趋势,该结果与 Bagust T J<sup>[5]</sup> 在 1979 年、Bulow V V<sup>[6]</sup> 在 1977 年的实验结果一致,REV 抗体随着鸡年龄的增加而降低。本实验结果表明,卵黄抗体与血清抗体两者具有相似的消长规律。卵黄抗体的 S/P 比值要稍高于血清抗体的值,原因可能是卵黄对抗体具有聚集作用而引起的。卵黄抗体与血清抗体 S/P 比值的统计学差异不显著,相关性良好,并且卵黄抗体与血清抗体阳性符合率为 97.5%,阴性吻合率为 100%,表明卵黄抗体检测确实能够反应血清抗体的水平,可用此方法判断鸡群是否感染过该病毒。采用卵黄进行抗体检测不仅能避免鸡群采血应激带来的经济损失,而且节省人力物力,是一种有效、易行、适合推广的监测鸡群质量状况的检测方法。值得注意的是,卵黄和血清一样,抗体的产生相比鸡群的感染是要滞后两周以上,因此不能筛查鸡群的早期感染,具有一定的滞后性。

参考文献:

[1] Y M Saif. 禽病学[M].北京:中国农业出版社,2012:663-688.

Y M Saif. Diseases of poultry[M]. Beijing: China Agriculture

Press, 2012:663-688.

[2] 全国动物防疫标准化技术委员会. GB/T 17999-2008 SPF 鸡微生物学监测[M].北京:中国标准出版社.

Nationgal Technical Standardization Committee of Animal Epidemic Prevention. GB/T 17999-2008 Microbiological monitoring of SPF chickens[M]. Beijing: China Standard Press.

[3] 黄小洁,姚文生,杨承槐,等.ELISA 法检测种蛋卵黄中禽网状内皮组织增生症病毒抗体的研究[J].中国兽药杂志,2016,50(2):7-11.

Huang X J, Yao W S, Yang C H, et al. Study on the ELISA detection for avian reticuloendotheliosis virus antibody in egg yolk [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50 (2):7-11.

[4] Vicco V Bulow. Immunological effects of reticuloendotheliosis virus as potential contaminant of Marek's disease vaccines[J]. Avian Pathology, 1977, 6: 4, 383-393.

[5] Bagust T J and Grimes T M. Experimental infection of chickens with an Australian strain of reticuloendotheliosis virus. 2. serological responses and pathogenesis [J]. Avian Pathology, 1979, 8:375-389.

[6] Bulow V V. Immunological effects of reticuloendotheliosis virus as potential contaminant of Marek's disease vaccines [J]. Avian Pathology, 1977, 12:179-198.