

# 病毒性肿瘤病常见问题问答

美国禽病病理家协会肿瘤病委员会  
American Association of Avian Pathologists Tumor Virus Committee (2012)

主译：王金萍（云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室）

审译：崔晓萍（勃林格殷格翰投资有限公司亚洲动物保健研发中心）

## 一、在野外条件下疫苗能 100% 保护免疫禽类不被马立克氏病病毒感染吗？

不能。从生物学角度来看，马立克氏病疫苗和其他疫苗一样在野外条件下很难达到对免疫动物 100% 的保护。马立克氏病对免疫系统健康，免疫程序恰当，且饲养管理良好的鸡群的成活率和生产性能没有明显影响，由该病造成的损失也很低。在早期野外感染严重的免疫鸡群中，据观察蛋鸡和种鸡死亡率在 2-5%，肉鸡在屠宰检疫时的淘汰率不高于 0.05%。

## 二、哪种马立克氏病单苗或多价苗能最大程度预防肉鸡，蛋种鸡或商品蛋鸡野外感染？

**（一）肉鸡：**一般用 HVT 单苗或 HVT+SB1 二价苗免疫。HVT+SB1 二价苗用于马立克氏病超强毒（vvMDV）流行，且单独使用 HVT 单苗不能达到最佳免疫效果的地区。当马立克氏病超超强毒（VV+MDV）流行时，有可能 HVT+SB1 二价苗也无法提供足够的免疫保护，尤其是对于重型鸡（比如公鸡），这时就要使用 HVT+CVI988（Rispens）二价苗或 HVT+SB1+CVI988（Rispens）三价苗进行免疫。

用低于推荐剂量疫苗免疫肉鸡非常普遍，但这种做法应引起重视，因为一旦遭到野外强毒攻击，这样做会导致马立克氏病的爆发，并可能对马立克氏病病毒朝更强毒力进化起到推动作用。

**（二）种鸡和商品蛋鸡：**通常免疫全剂量 HVT+CVI988（Rispens）二价苗，这样可以保证这些饲养周期较长的禽类在整个饲养过程中都能获得最大程度的保护而不发生马立克氏病。超超强毒（VV+MDV）流行地区的肉种鸡应该免疫 HVT+SB1+CVI988（Rispens）三价苗。

### 三、 什么时候更改免疫程序将 HVT 单苗调整成 HVT+SB1, HVT+CVI988 (Rispen) 二价苗或 HVT+SB1+CVI988 (Rinspen) 三价苗, 以提高种鸡的保护水平?

种鸡最好免疫 HVT+CVI988 (Rispen) 二价苗 (见问题 2)。如果接种了 HVT 单苗或 HVT+SB1 二价苗的种鸡对马立克氏病抵抗力低下, 就要考虑将疫苗换成 HVT+CVI988 (Rispen) 二价苗或 HVT+SB1+CVI988 (Rispen) 三价苗。

### 四、 为什么疫苗对马立克氏病病毒野外感染的预防效果不能仅用“屠宰检疫淘汰率”这个参数来评价?

对青年禽来说, 仅用“屠宰检疫淘汰率”这个指标不能客观评价疫苗对马立克氏病的预防效果, 因为其他几种疾病 (比如呼吸系统疾病, 传染性法氏囊病和禽败血病等) 也会使鸡在屠宰检疫时被淘汰。在免疫恰当的鸡群中, 马立克氏病造成的鸡只淘汰总是低于其他疾病造成的。在评价肉鸡马立克氏病预防效果时, 还应考虑“白血病”造成的淘汰鸡比例, 由于二者的大体病变很相似, “白血病”也会被归因于马立克氏病病毒, 但二者还是有所区别 (马立克氏病病毒引起的淋巴瘤与白血病病毒引起的淋巴瘤分布在不同器官, 马立克氏病病毒会引起皮肤以及腿部的病变)。

除了肿瘤, 马立克氏病也会造成一些非肿瘤性的综合症, 包括神经综合症, 眼部病变, 免疫抑制和动脉硬化。这些非瘤性病变, 尤其是免疫抑制可能会增加鸡只在没有肿瘤情况下被淘汰的比例, 肉鸡发生肿瘤时, 淘汰率会增加, 然而, 非瘤性马立克氏病发病情况却无法从淘汰率上直接体现。虽然认为疫苗免疫能大大降低马立克氏病引起的非肿瘤综合症, 但对疫苗怎样预防马立克氏病病毒介导的免疫抑制却知之甚少。

基于以上各种原因, 不能仅用“屠宰检疫淘汰率”这个参数评价马立克氏病疫苗对病毒野外感染的预防效果。

### 五、 马立克氏病病毒引起的免疫抑制在没有肿瘤样病变增加的情况下是如何表现的?

马立克氏病病毒可以通过不同的致病机理引起免疫抑制, 有些机理尚不完全清楚, 但可以肯定马立克氏病病毒造成的免疫抑制比肿瘤发生要早得多。马立克氏病对鸡的影响, 尤其是对肉鸡, 主要表现为造成无抵抗力鸡群的免疫抑制, 免疫抑制使机体对抗原的应答能力低下甚至缺失, 从而导致继发感染 (比如大肠杆菌引起的气囊炎) 增加, 抗体应答差或接种的其他疫苗 (比如传染性支气管炎) 保护力低下。最近

研究表明，仅有部分免疫保护力的禽类感染了马立克氏病超强毒（VV MDV）后，在形成肿瘤之前就可以检测到鸡群增重明显下降。

对马立克氏病病毒引起的免疫抑制病还需进一步的研究，因为该病并不总是表现出免疫器官萎缩，野外条件下很难进行判断。

## 六、对种鸡进行马立克氏病二次免疫有什么作用？

无论在野外还是实验室条件下二次免疫都可以增强家禽抵抗力。

常用的二次免疫程序有以下几种：

（一）鸡胚内首次免疫，然后在孵化场进行二免。

（二）一日龄雏鸡孵化场内首次免疫，两个小时后或运到养殖场进行二免。也有一日龄雏鸡运到养殖场后进行首次免疫，几天或 2-3 周后再进行二免。

最新研究表明，二次免疫的效果取决于是否使用了更高保护力的疫苗，另外，鸡胚内首次免疫后在孵化场进行二免是最佳双免程序，这样安排不仅可以给免疫鸡提供更好的保护，还因为孵化场有完善的后勤保障，两次免疫都在孵化场中进行，所有鸡在接触野毒前已完成了疫苗接种，而其他几种程序中，二次免疫要在养殖场进行，很可能进行二免前的鸡早已暴露于野毒中。

另外，在野外条件下，总有少部分鸡在单次免疫过程中错过免疫或没有得到足够剂量免疫，二免可以减少漏免或免疫剂量不足的发生，因为这种情况发生在同一只鸡上的几率极小。

## 七、马立克氏病病毒能与其他引起肿瘤的病毒（网状内皮增生病毒，禽白血病病毒）混合感染吗？

能。感染了马立克氏病病毒或免疫马立克氏病疫苗的鸡也会被禽白血病病毒和/或禽网状内皮增生病毒感染。由于马立克氏病病毒感染的普遍存在，可以肯定野外条件下绝大部分鸡都携带马立克氏病病毒，被马立克氏病病毒感染并形成了肿瘤的鸡也会同时被逆转录病毒感染。

## 八、如果怀疑马立克氏病疫苗无效该怎么做？

如果发现马立克氏病疫苗无效，首先要在孵化场开展免疫审查工作。多个疫苗制造商以及鸡胚接种设备供应商可以对疫苗存储，操作，稀释以及免疫程序进行审查。

一旦发生马立克氏病免疫失败，请按下列步奏进行审查：

（一）审查疫苗冷链管理

（二）疫苗滴定：测定厂家提供的疫苗以及稀释过的疫苗滴度，以排除免疫失败

是由疫苗稀释程序不当造成的。用于疫苗滴度测定的细胞与疫苗厂家制备疫苗所用细胞在培养条件上会有所不同，实际测定的疫苗滴度与疫苗厂家提供的滴度可能不完全一致，但我们仍然可以通过测定的疫苗滴度来了解瓶内疫苗或稀释后的疫苗滴度是否在合理的水平。如果不能进行疫苗滴度测定，计数疫苗中的活细胞数也可以间接了解疫苗状况。（更多细节见问题 17）

**（三）测定免疫鸡羽毛囊内 DNA 含量：**以确定疫苗是否被正确接种以及是否在鸡体内进行了复制。

**（四）监测早期野毒感染：**鸡胚免疫或一日龄雏鸡皮下免疫疫苗后需 5-7 天才能产生完全保护，如果在完全免疫建立前有野毒感染也会导致免疫失败。

**（五）排除其他免疫抑制病因素：**比如禽传染性贫血病病毒，传染性法氏囊病病毒，呼肠孤病毒，感染性丁亚型白血病病毒，霉菌毒素和应激等，以上因素均可导致鸡对马立克氏病病毒的抵抗力下降，造成免疫失败。

**（六）掌握当前流行野毒的致病型：**针对病毒流行情况免疫相应疫苗，因为不是所有疫苗都能充分预防高毒力马立克氏病病毒感染（比如 HVT 单苗不能很好的保护免疫鸡不受马立克氏病超强毒感染），这也是造成免疫失败的原因。

#### **九、羽髓可以用来测定疫苗保护力、检测感染程度、鉴别马立克氏病血清型吗？**

用荧光定量 PCR (qPCR) 检测羽髓样品是一项非常实用的技术，可以确定鸡群免疫情况以及疫苗病毒是否在鸡体内完全复制。但要注意，疫苗病毒在鸡体内完全复制并不能保证对鸡完全保护（鸡产生免疫力）。在下列情况中，即使检测到疫苗在鸡体内达到了理想保护水平，仍会发生马立克氏病：

**（一）早期感染马立克氏病病毒（在疫苗产生理想免疫应答之前感染马立克氏病病毒）的鸡群。**

**（二）暴露于高毒力马立克氏病病毒而传统疫苗免疫不能提供良好保护的鸡群。**

**（三）免疫抑制病（如鸡传染性贫血，传染性法氏囊，网状内皮增生病等病毒感染）共感染的鸡群。**

正在形成肿瘤的鸡羽髓和外周血液中马立克氏病病毒 DNA 含量比没有肿瘤的鸡要高得多，因此羽髓样品可用于马立克氏病的早期诊断。测量 3-4 周龄鸡羽髓中马立克氏病病毒 DNA 含量可以作为判断鸡群是否可以抵抗马立克氏病的一个间接依据。实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法能够鉴别马立克氏病病毒的不同血清型，可以将马立

克氏病 I 型（比如致病 I 型，CVI988）与疫苗株 II 型（比如 SB1）和疫苗株 III 型（比如 HVT）区分开，但目前的分子生物学技术还不能鉴别致病型。用相应致病型马立克氏病病毒攻击免疫鸡的生物学试验仍是确定致病型的首选方法。

用于检测的羽髓样品可于-70℃冻存，或者用 FTA 卡（处理过的滤纸，能够保留病毒 DNA/RNA, 破坏蛋白质而使病原失活）采集（细节见问题 24）。如果样品来自国外，在进入美国前需要得到美国动植物卫生检疫局（APHIS）的进口许可。

#### **十、哪里可以买到给散养鸡免疫的马立克氏病疫苗？都有哪些产品？怎样进行免疫？**

可以从不同家禽疫苗厂家买到马立克氏病疫苗，最好选择（HVT+CVI988 (Rispens) 二价苗，这样可以达到最广谱的保护效力。马立克氏病疫苗是细胞依赖性疫苗，也就是说疫苗毒要在活细胞内才能维持其感染性。疫苗需冻存于-196℃液氮罐内保存和运输，使用前要用厂家提供的特定稀释液进行稀释，采用颈部皮下注射方式于孵化场内对雏鸡进行免疫接种，稀释后的疫苗必需在 1-2 小时内用完。

商品疫苗的最小剂量是 1000 羽份/瓶，疫苗在稀释后短时间内就会失效，必须尽快使用，没有用完的也要销毁，不能保存下次再用，如果只有少数几只鸡需要免疫确实会造成疫苗浪费，但我们仍强烈建议按疫苗厂家提供的运输，保存，稀释以及免疫指导进行操作。

网站上可以买到的马立克氏病疫苗基本都是只含有火鸡疱疹病毒(HVT)的冻干苗，疫苗在使用前需 2-7℃冷藏保存，这种疫苗虽然只能给鸡提供最基本的免疫保护，但对于少量庭院散养鸡已经足够了，疫苗稀释后要在 2 小时内用完，没用完的也不能保存下次再用。

#### **十一、马立克氏病疫苗可以保护鸡不被马立克氏病病毒感染吗？**

不能。马立克氏病疫苗不能保护鸡不受马立克氏病病毒的进一步感染，但有助于减少肿瘤的形成。检测到免疫健康鸡群中有致病型马立克氏病病毒与该病的诊断没有直接关系，只表明该鸡群曾被致病性马立克氏病病毒感染，且正在排毒。

#### **十二、检测鸡体内致瘤性马立克氏病病毒有什么诊断意义？**

没有任何诊断意义。免疫鸡群中检测到致瘤性马立克氏病病毒和该病的诊断没有任何关系。因为马立克氏病病毒在家禽养殖场内分布广泛，可以说野外条件下每只鸡都暴露于致瘤型马立克氏病病毒之中，马立克氏病疫苗可以保护免疫鸡不发生肿

瘤，但不能保护鸡不被致瘤性病毒感染，所以没有形成肿瘤的鸡群也能检测到致瘤性病毒。

### **十三、马立克氏病疫苗与其他疫苗混合使用有什么影响？**

将马立克氏病疫苗与其他疫苗混合后接种鸡胚或一日龄雏鸡会干扰马立克氏病疫苗的免疫，只有按疫苗厂家建议的疫苗品种和剂量混合接种才是安全的，不按厂家指导进行疫苗接种可能会导致鸡对马立克氏病免疫应答低下。

### **十四、马立克氏病疫苗与抗生素混和使用有什么影响？**

目前尚无任何抗生素获得官方审批用于马立克氏病疫苗的免疫，然而有时一些未经药理实验证明可以使用的抗生素也会加入疫苗稀释液与马立克氏病疫苗同时注射，尤其是在免疫肉鸡时，常用于马立克氏病免疫的抗生素是庆大霉素和头孢噻吩。已证明，使用治疗剂量的抗生素不会对马立克氏病疫苗毒造成不良影响，如果增加抗生素剂量则会改变稀释液的 PH 值和渗透压，从而影响马立克氏病疫苗滴度。美国和一些国家要求有兽医处方才能使用上述抗生素。有时染料也被加到稀释液中，以便监测免疫是否成功，染料要按疫苗厂家推荐的品种和浓度使用，而且抗生素和染料都必须在加入疫苗前与稀释液充分混匀。

### **十五、HVT 常规疫苗和 HVT 重组疫苗可以一起用吗？**

不可以。不能同时接种 HVT 重组疫苗和 HVT 常规疫苗，也不可以鸡胚接种 HVT 常规疫苗一日龄再免疫 HVT 重组疫苗，反之也不行。HVT 常规疫苗会干扰 HVT 重组疫苗，造成重组疫苗中插入的外源基因蛋白（如新城疫病毒，传染性法氏囊病毒等）的免疫效果差，未观察到同时使用对马立克氏病的保护力有影响。

### **十六、马立克氏病疫苗最低保护剂量（最大稀释倍数）是多少？**

本文很难提供商品疫苗的最低保护剂量，这些数据应该从各疫苗厂家获得。病毒的实际浓度用每羽份蚀斑形成单位（PFU）表示，一个蚀斑形成单位等于一个病毒感染的细胞（例如 5000PFU/羽份的 HVT 疫苗，表示该疫苗每羽份含有大约 5000 个病毒感染细胞）。

一般 HVT 疫苗每羽份大约含有 2000 个蚀斑形成单位(PFU),SB1 和 CVI988 (Rispens) 每羽份分别含有 1000 个蚀斑形成单位（PFU），所有疫苗厂家须确定自己疫苗的有效滴度，不同厂家的滴度也不一样。饲养周期长的蛋鸡和种鸡需接种高滴度的疫苗，要求每羽份 HVT 疫苗最低含有 5000 个蚀斑形成单位(PFU),SB1 或 CVI988 (Rispens)

每羽份最低含有 3000 个蚀斑形成单位 (PFU)。在美国肉鸡饲养业中，用低于推荐剂量疫苗免疫是普遍现象，但要求 HVT 疫苗不能低于 4000PFU/羽份，SBI 不能低于 3000PFU/羽份。需要注意的是，如果饲养环境污染了高毒力的马立克氏病病毒，低于推荐剂量免疫会降低对鸡的保护力（见问题 5）。

#### **十七、能用马立克氏病疫苗中的活细胞数来计算疫苗滴度吗？**

不可以。活细胞计数能间接反应疫苗在运输，稀释和免疫等过程中的情况，如果疫苗处理不当，活细胞数量低，疫苗滴度也低。目前大部分马立克氏病疫苗都是用细胞培养方法生产的细胞依赖性冷冻苗，收获的感染性活细胞加入特殊稳定剂后注入安瓿于-196℃液氮中冷冻保存。切记马立克氏病疫苗细胞依赖的特点，如果细胞死亡，病毒也不能存活。维持病毒感染性滴度的关键是维持细胞活力。计数时，如果活细胞数很低说明病毒滴度也低，但活细胞数量高并不能充分表明疫苗滴度高，因为并不是每个活细胞都会被疫苗毒感染，所以确定疫苗效价的唯一方法是在细胞培养物中进行滴定（蚀斑实验），滴定的病毒滴度用每羽份蚀斑形成单位（PFU/羽份）表示。

#### **十八、食用感染致瘤病毒的鸡安全吗？**

安全。尽管进行了大量流行病学研究但没有证据表明马立克氏病和禽白血病有任何公共卫生方面的危害，不管马立克氏病还是禽白血病都不会感染人类或导致任何人类疾病，所以绝对不必担心。

#### **十九、一般情况下商品禽类肿瘤病发生率大概有多少？**

这要看引起肿瘤的病因。大多数种鸡经过净化对外源性逆转录病毒不敏感，由外源性逆转录病毒引起的肿瘤发生率理论上应该为零。也有报道称无特定病原体鸡（SPF 鸡）虽然外源性逆转录病和马立克氏病病毒均为阴性，仍会形成自发性淋巴瘤，可是即使有自发性肿瘤病例的存在，其发生几率也极低，由此造成的经济损失可以忽略不计。在野外条件下，判定引起这些自发性肿瘤的病因至关重要，以确定这些鸡是否确实为外源性逆转录病毒阴性。

马立克氏病病毒在环境中普遍存在，疫苗并不能提供 100%保护。马立克氏病疫苗在实验条件下有效率可达 95-97%，然而在野外实际应用中可能存在马立克氏病病毒早期感染（在疫苗免疫完全建立以前），或有其他免疫抑制病共存，在这些情况下疫苗保护效率可能会降低，所以个别鸡发生马立克氏病并形成肿瘤也很正常。一旦发

现由马立克氏病病毒引起的肿瘤发病率有所增加就需要对免疫程序和方法，生物安全措施，其他免疫抑制病的控制，和/或是否存在更强毒力的致病型马立克氏病病毒进行重新评估。

## 二十、当怀疑肿瘤病时，应送检哪种组织用于组织病理学检查？

与正常组织相连的肿瘤样品，各种神经丛（坐骨神经，臂神经和迷走神经），法氏囊（如果法氏囊还存在）以及任何有可疑病变的组织都可以送检。送检样品应采自刚安乐死或死亡时间不超过 24 小时的禽，更多关于送检样品的细节见肿瘤诊断指南第 11 页。

进口福尔马林固定的样品到美国进行诊断必须遵守法规并获得正式进口许可证，请提前与诊断实验室联系以便获得美国动植物检疫局的许可，许可证必须与样品同行。

## 二十一、怎样固定用于组织病理学检查的样品？

所有样品要尽快放置于 10%中性福尔马林缓冲液中。为保证样品完全固定，福尔马林与样品的比例应为 10:1，如图 1 和 2 所示方法提交样品是不正确的。请不要送检死亡时间超过 24 小时禽组织样品。

图 1

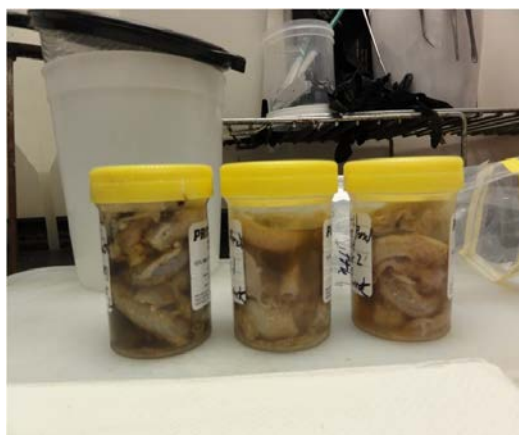


图 2



如果组织样品装在盒子中送检，不要将盒子装得太满，请注意图 3 中盒子印在组织上的痕迹会妨碍显微观察时对病变的判断。

图 3





## 二十二、如何运输福尔马林固定的样品？

福尔马林是一种有害液体，福尔马林固定的样品应装在防漏容器中运输，或者在固定 24 小时后，倒掉大部分福尔马林溶液，将容器封好以防止液体泄露并使样品保持湿润。用“Whirpak”无菌采样袋空运固定好的样品时，由于货仓气压不足，会导致样品紧缩和变形（比如眼球组织）。包埋好的组织块也可以送检，但应注意夏天的高温可能导致固体石蜡融化，如图 4 所示。

图 4



装样品的容器上和实验室样品提交表中都要注明样品信息，信息应包括特征描述和马立克氏病免疫状况，如果没有样品提交表，则要尽可能详细写明发病鸡群的全部信息，包括年龄，鸡的类型（肉鸡，肉种鸡，蛋鸡等），临床症状，大体病变等。仅注明“用于组织病理切片的组织”不是样品的信息，也不是提交的原因，只是告知了希望做什么实验。

## 二十三、荧光定量 PCR 在马立克氏病诊断中的作用？为什么传统 PCR 不能用于马立克氏病的诊断？

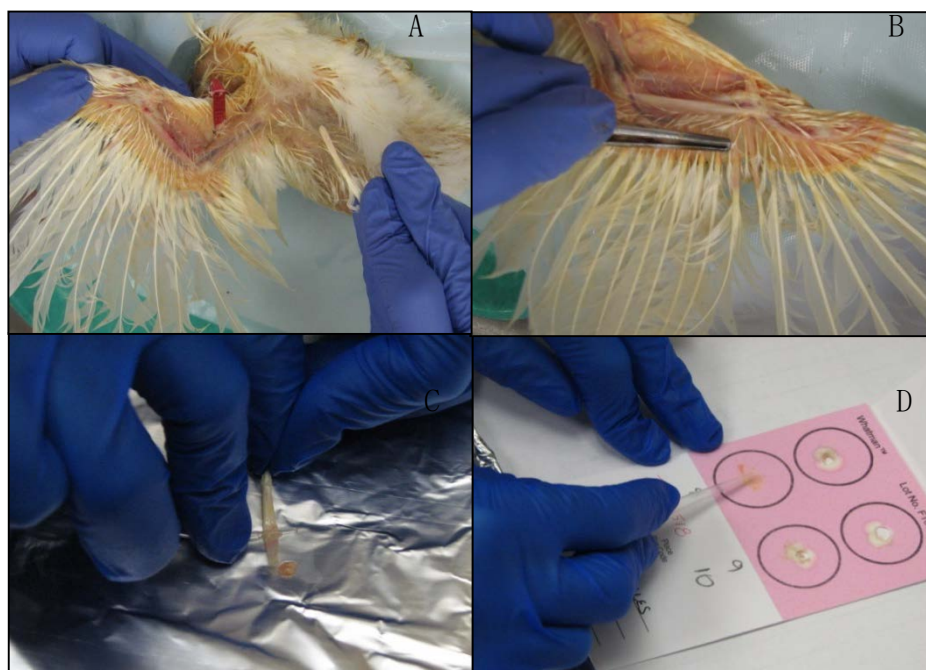
马立克氏病病毒分布广泛，所有鸡（健康鸡和病鸡）都可能被致瘤性病毒感染，如果是隐性感染，感染鸡仍表现健康（尽管已经感染病毒），如果感染后发展成肿瘤则发生马立克氏病。由于该病毒在环境中的广泛存在，任何能检测到致瘤性马立克氏病病毒的技术，如病毒分离，传统 PCR，抗原检测，致瘤 meq 基因序列测定等对马立克氏病诊断都没有什么价值，检测到鸡体内有致瘤性病毒只能说明鸡曾经感染了该病毒，并不能说明鸡是否发生马立克氏病。研究表明，形成马立克氏病肿瘤的组织比隐性感染的组织中含有更多病毒 DNA 拷贝数，而实时荧光定量 PCR 可以测定马立克氏病病毒 DNA 含量，因此该方法可以用于鉴别马立克氏病肿瘤和隐性感染组织。

## 二十四、进行 PCR 和/或荧光定量 PCR 诊断应提交什么样品？

用于荧光定量 PCR 检测的理想样品是冷冻或印在 FTA 卡上的肿瘤组织。冷冻的羽毛尖，冷藏的血液（用 EDTA 作为抗凝剂），印在 FTA 卡上的羽髓或血液均可用于检测。每只鸡的样品要保持独立，不要把不同鸡的样品混在一起检测，否则会造成假阴性。

翼下新生羽毛是羽髓样品的最好来源（图 5A），拔出有新鲜羽髓的羽毛（图 5B），平摊在洁净的锡箔纸上用灭菌塑料滴头挤压出羽髓（图 5C），然后用同一滴头将羽髓样品涂布在 FTA 卡上（图 5D）。

图 5:



组织和血液也可收集在 FTA 卡上，如果同一只鸡的不同组织收集在同一个圆圈中，不要将他们混合检测，否则会造成假阴性。

运送收集了样品的 FTA 卡到美国检测须遵守州和联邦法规并取得正式许可证，请提前联系诊断实验室以便获得美国动植物检疫局进口许可，许可证必须与样品同行。

## 二十五、病毒分离有助于肿瘤病鉴别诊断吗？

大多数品系的鸡已被净化而无外源性逆转录病毒感染，商品鸡群中也不应检测到逆转录病毒。所以病毒分离有助于外源性逆转录病毒和网状内皮增生病的诊断，而致瘤性马立克氏病病毒的分离却对诊断没有什么价值。

## 二十六、建议送检什么样品进行病毒分离？

马立克氏病病毒可以从白细胞层，脾细胞和肿瘤细胞中分离。最好送检活鸡到实验室进行病毒分离。另外冷藏的血液（用肝素做抗凝剂），脾细胞，或者冷藏 1-2 小时的肿瘤细胞也可以用于病毒分离。

很多组织材料可以用来检测感染性逆转录病毒，病毒性抗原，或抗体。全血或血浆是最常见的用于病毒分离的材料，泄殖腔或生殖道拭子或鸡蛋蛋白都可以用于病毒分离。用于感染性逆转录病毒生物学鉴定的样品应置于冰水浴中操作，如果暂时不用要置于-70℃保存备用。检测禽白血病病毒群特异性抗原 (p27<sub>gsa</sub>) 的样品应按不同的实验方法置于特定缓冲液中，-20℃保存，比如用于酶联免疫吸附试验的样品要放在含有 0.1%吐温-80 的磷酸盐缓冲液中。

在美国，大多数实验室不能接收国外样品分离病毒。若想获得更过关于病毒分离的细节请联系 OIE 参考实验室。

### **二十七、禽白血病 E 亚群诊断(检测)有何意义？禽白血病 E 亚群能引起肿瘤吗？用 PCR 方法检测慢羽系和快羽系禽白血病 E 亚群的比较？**

可遗传的内源性白血病病毒称为禽白血病 (ALV) E 亚群。几乎所有健康鸡中都存在该病毒的完整或缺陷基因组。迄今为止，还没有禽白血病内源毒能引起肿瘤的确凿证据，但已确定这些病毒会增加鸡对禽白血病外源病毒感染的敏感性并形成肿瘤，虽然 E 亚群 ALV 感染本身不一定会引起肿瘤，但是先天感染或出壳即感染 E 亚群 ALV 的鸡往往死淘率较高，对白血病外源病毒更易感，这可能与早期感染 E 亚群 ALV 容易产生对 ALV 的免疫耐受有关，导致在禽白血病外源病毒感染后不易产生相应特异性抗体。

鸡细胞基因组某个特定位点含有能复制可传染性病毒粒子的 E 亚群 ALV 的全基因组，如传染性染色体 Z 上与决定快慢羽相关基因 K 紧密连锁的内生病毒 21 (EV21) 位点，与初生雏鸡羽毛生长速度有关，是与快慢羽位点紧密连锁的位点，大部分慢羽系鸡体内含有这种被称为 EV21 的内源性逆转录病毒。将可疑物接种对禽白血病 E 亚群病毒敏感和有抵抗力的两种鸡胚成纤维细胞，从抗原检测为阳性的培养物上清液中提取 RNA, RT-PCR 扩增其 gp85 基因，经序列分析来诊断感染性内源性病毒，也可以检测培养物中抗 p27 抗原来诊断是否为传染性 E 亚群 ALV。

## 二十八、为什么 E 亚群禽白血病在肉种鸡和商品蛋鸡中没被净化？

大多数肉种鸡和商品蛋鸡无法摆脱内源性逆转录病毒或病毒基因，因为逆转录病毒能将遗传信息整合进宿主体细胞和生殖细胞内，作为宿主基因组的一部分，父母代按孟德尔遗传概率以基因传播的方式遗传给子代。虽然通过遗传选育可以实现无内源性病毒鸡群，但是对鸡的一些重要生产性能和指标可能会有负面影响，因此内源性病毒净化还没用于生产实践中。

## 二十九、外源性逆转录病毒和内源性逆转录病毒有什么不同？

内源性病毒或病毒基因发生于大部分鸡体细胞和生殖细胞系中，以基因方式传播，而外源性禽白血病病毒是可以在鸡之间垂直（母鸡传给子代）或水平传播的感染性病毒。内源性病毒属于禽白血病病毒 E 亚群，而鸡外源性病毒则由 A, B, C, D 和 J5 个亚群组成。

## 三十、未检测到肿瘤病毒能确诊肿瘤病吗？

家禽体内的肿瘤大部分是由病毒引起的，但并不是全部。因此，在没有发现任何病毒的情况下出现肿瘤也很正常（比如鳞状细胞癌，卵巢腺癌等）。SPF 鸡中也曾发生散发性淋巴瘤，但与任何病毒感染无关。

有两组病毒可以引起家禽肿瘤病，疱疹病毒（马立克氏病）和逆转录病毒（禽白血病病毒群，网状内皮增生病和火鸡恶性淋巴组织增生病）。

马立克氏病病毒引起的肿瘤中一定存在马立克氏病病毒，但马立克氏病病毒也会存在于隐性感染而无肿瘤的组织中，仅检测到组织中存在马立克氏病病毒没有任何诊断价值，对马立克氏病病毒 DAN 进行定量是确定肿瘤病因的必要方法。

由于禽白血病病毒的广泛分布，病毒分离，证明抗原或抗体的存在对野外肿瘤病例诊断没有意义或意义有限，但对减少或根除种鸡群禽白血病感染却有指导意义。禽白血病病毒引起的特有的外观病变或显微病变可能在未检测到抗原或抗体的情况下出现。免疫组化和分子实验经常用于鉴别肿瘤细胞表型。

## 三十一、如何确诊肿瘤病的主要病因？

家禽肿瘤病的诊断需要很多程序，具体可参考美国禽病病理家协会的“肿瘤病诊断指南”，诊断大体过程如下：

**（一）流行病学和临床资料：**逆转录病毒介导的肿瘤比马立克氏病肿瘤需要更长的形成时间，所以 14 周龄以内鸡的肿瘤很可能是由马立克氏病病毒引起的，14 周

龄以上鸡的肿瘤则可能由上述两种病毒引起。

## （二）大体病变：

1. 逆转录病毒不引起神经系统的肿瘤，如果除了内脏肿瘤外还有外周神经肿大，可能是由马立克氏病病毒引起的，如果没有神经病变，两种病毒都有可能。

2. 肿瘤发生在法氏囊很可能是由逆转录病毒引起的，但是马立克氏病病毒也会引起法氏囊肿瘤，病变的组织病理学诊断是确诊的必要方法。

## （三）组织病理学：

1. 逆转录病毒在法氏囊滤泡内转化，而马立克氏病病毒在滤泡间转化。如果法氏囊出现病变，可以通过组织病理学确诊肿瘤是由哪种病毒引起的。

2. 外周神经出现淋巴瘤病变可以确诊是由马立克氏病病毒引起的。

3. 马立克氏病肿瘤由多种细胞组成，逆转录病毒肿瘤是由一种细胞组成，通过鉴定肿瘤中细胞种类可以确诊病因，前提是样品被正确固定并不能发生自溶，否则很难对细胞形态进行鉴定。

4. 脑和眼部的病变仅表明马立克氏病病毒感染但不是马立克氏病特有指征。

## （四）其他实验室确诊方法

### 1. 马立克氏病

（1）实时荧光 PCR：对肿瘤，血液和骨髓样品进行实时荧光定量 PCR，马立克氏病病毒引起的肿瘤组织中马立克氏病病毒 DNA 含量比隐性感染的组织中要高。

### （2）免疫组化法

马立克氏病病毒引起的肿瘤由 T 淋巴细胞组成，逆转录病毒引起的肿瘤由 B 淋巴细胞组成，用免疫组化标记物检测细胞表型有助于肿瘤病诊断。通过免疫组化法检测马立克氏病病毒 meq 基因可以确诊马立克氏病。

### 2. 逆转录病毒

（1）可以通过 PCR 和免疫印迹检测逆转录病毒。

（2）血清学方法和病毒分离方法。

## 三十二、美国哪些实验室可以诊断病毒性肿瘤病？

美国农业部农业研究组织 (USDA-ARS) 的禽病和肿瘤学实验室 (Avian Disease and Oncology Laboratory) 是公认的国家级禽肿瘤病参考实验室，也是世界动物卫生组织 (OIE) 马立克氏病参考实验室。

OIE 参考实验室可以对肿瘤病诊断给予协助，提供标准化诊断试剂和技术，开展培训和咨询服务。USDA-ARS 可以提供的诊断试剂主要有多克隆和单克隆抗体，参考毒株和抗原以及各种用于病毒分离的细胞系等，如有更多需求请联系位于密歇根东兰辛（Avian Disease and Oncology Laboratory in East Lansing, Michigan）的禽病和肿瘤病研究室，网址 <http://www.ars.usda.gov/mwa/lansing/adol>，通常 USDA-ARS 和有需求的研究机构要签订材料运输协议书（MTA）。

诊断网状内皮增生病病毒（REV）和禽白血病病毒群（ALVs）各亚型的 PCR 引物都已公开发表，PCR 引物序列可以从 USDA-ARS 网站查询。  
(<http://www.ars.usda.gov/mwa/lansing/adol>)

除了 OIE 参考实验室外，美国境内一些大学的实验室和专门的肿瘤诊断实验室也可以协助诊断和提供咨询服务。

### **三十三、怎样诊断网状内皮增生病病毒（REV）感染？网状内皮增生病病毒是肿瘤性疾病的主要原因还是次要原因？**

许多体内和体外试验都可以用来检测可疑病例中的网状内皮增生病病毒（REV）。在某些田间情况下，网状内皮增生病病毒会成为肿瘤的主要病因，如使用污染 REV 活病毒的疫苗进行免疫，或家禽早期感染了 REV。将可疑病料接种鸡胚成纤维细胞（CEFs）或无特定病原体（SPF）鸡，用 REV 特异性多克隆或单克隆抗体通过免疫荧光法来检测接种物中是否存在 REV 病毒抗原或前病毒。用 PCR 方法扩增 REV 长末端序列（LTR）的 219 对碱基，可检测细胞培养物或 SPF 鸡血液中前病毒 DNA，并可确定病毒亚型。检测到网状内皮增生病抗体的存在不能确诊肿瘤病，只说明曾经感染了 REV。

### **三十四、仅靠组织病理学检测能确诊肿瘤病因吗？初步诊断和确诊有什么区别？**

组织病理学是目前已知的可以确定肿瘤特性，有助于肿瘤病诊断的首选方法，也是判断组成肿瘤的细胞类型，肿瘤扩散情况和是否恶性的最好方法，但组织病理学方法在确定肿瘤病因方面还有很多局限性。虽然有时可以根据病变位置和组成肿瘤的细胞特性做出初步诊断，比如是淋巴白血病，骨髓白血病或马立克氏病，但淋巴白血病也可能由禽白血病病毒或网状内皮增生病病毒引起，甚至可能是自发性的，很难用组织病理学方法鉴别病因，而且有些肿瘤病例用组织病理学方法也无法鉴别是马立克氏病还是淋巴白血病。

### **三十五、免疫组化法可以用来鉴别诊断淋巴瘤吗？福尔马林固定的样品能用于免**



## 免疫组化诊断吗？

免疫组化法可以用来诊断禽肿瘤病，如果组成肿瘤的大部分是 T 淋巴细胞，很可能是马立克氏病，如果大部分是 B 淋巴细胞则可能是淋巴白血病，但免疫组化法有下列局限性：

（一）网状内皮增生病可以产生 T 淋巴细胞性肿瘤也可以产生 B 淋巴细胞性肿瘤，如果怀疑网状内皮增生病毒感染还要做进一步的试验。

（二）很可能在未感染外源性禽白血病病毒的鸡体内发现 B 淋巴细胞型肿瘤，这些肿瘤被称为自发性肿瘤，被认为是由内源性逆转录病毒引起的。

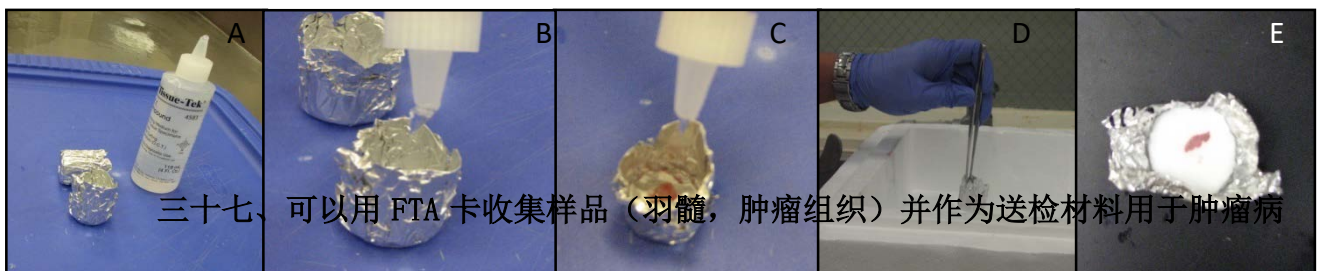
（三）用抗体检测福尔马林固定的样品鸡体细胞表型效果不是很好，最好将样品置于液氮中速冻后用于检测，如何速冻样品见问题 3 6。大部分美国实验室不接受来自国外的冷冻样品，如果有冷冻样品需要检测，可以联系 O I E 参考实验室以便获得更多资讯。

免疫组化法也是一种检测马立克氏病致癌 meq 基因的好方法，由于 meq 基因的表达量在马立克氏病病毒引起的肿瘤中非常高，因此是确诊马立克氏病的特异方法，但遗憾的是目前还没有商品化抗 meq 基因抗体。另外 meq 基因是核抗原，免疫组化染色时需要使用酪酰胺信号放大技术才能获得正确的结果。

### 三十六、怎样冷冻用于免疫组化法检测的样品？

图 6 所示为冷冻用于免疫组化检测样品的步骤。新鲜样品要置于 OCT 冷冻切片包埋剂（Tissue Tek, Sakura Finetek, Torrance, USA）中（如图 6A-C），首先将一滴包埋剂滴在锡箔纸做的模子中（图 6B），然后将样品置于其上，将 OCT 注满模子，要避免产生气泡（图 6C），将装有样品和 OCT 的模子置于液氮气体中（图 6D）直到 OCT 变成坚硬不透明的白色固体（图 6E），将包埋好的样品保存于-70℃，样品在低温切片前建议于-20℃放置一个小时。

图 6



三十七、可以用 FTA 卡收集样品（羽髓，肿瘤组织）并作为送检材料用于肿瘤病

### 检测吗？

可以。通过实时荧光定量 PCR 方法可以对 FTA 卡上收集的肿瘤或骨髓样品进行马立克氏病诊断。还可以用特异引物（该引物不能检测到内源性逆转录病毒）对 FTA 卡上收集的样品进行扩增用于检测逆转录病毒。如何用 FTA 卡收集组织病料见问题 24。