

应用 PCR技术对家禽病毒性肿瘤病 进行鉴别诊断的研究进展*

Current Research on the Differential Diagnosis of Avian Tumors by Using PCR Technique

何秀苗 王桂军 韦平

He Xiumiao Wang Guijun Wei Ping

(广西大学动物科技学院 南宁市秀灵路13号 530005)

(College of Animal Science and Technology, Guangxi Univ., 13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要 概述聚合酶链反应 (PCR) 技术应用于家禽马立克氏病、禽白血病和网状内皮增生症鉴别诊断的研究进展, 主要内容包括病毒的基因组结构特征, 各病毒的特异性基因或序列及其 PCR引物的位置和序列, 以及 PCR 技术对肿瘤病特异鉴别诊断的应用。将 PCR技术与其它传统的技术进行比较, PCR技术具有敏感性高、特异性好、快速、简便的特点, 是目前鉴别诊断家禽病毒性肿瘤病最有效的、最快捷的方法之一。

关键词 家禽病毒性肿瘤病 PCR 鉴别诊断 引物 研究进展

中图分类号 R 854.44

Abstract It is a review of current researches on the differential diagnosis of avian tumors e. g. Marek's Disease, Avian Leukosis and Reticuloendotheliosis by using the polymerase chain reaction (PCR) technique. The genome structures of the viruses, the unique genes or DNA fragments of each virus and their PCR primers' sites and sequences, the applications of PCR technique in the differential diagnosis of avian tumors and the comparison with the conventional diagnosis methods were detailed. PCR technique is one of the most efficient and rapid approaches to differentiate avian viral tumors for its simplicity, high sensitivity and specificity.

Key words avian virus-induced tumors, PCR, differential diagnosis, primers, current research

家禽的肿瘤病主要由致瘤性病毒所致, 其中最常见而且危害最大的是马立克氏病 (Marek's Disease, MD), 禽白血病 (Avian Leukosis, AL) 和网状内皮增生症 (Reticuloendotheliosis, RE)。MD是由疱疹病毒科的马立克氏病病毒 (MDV)引起的一种恶性肿瘤病, MDV能在内脏器官、皮肤和肌肉中诱发肿瘤; AL是由反转录病毒科、白血病/肉瘤病毒群的禽白血病病毒 (ALV) 引起的一系列家禽良性和恶性肿瘤病; 同属于反转录病毒科的网状内皮增生症病毒 (REV) 是 RE的病原, RE为一群病理综合症, 包括急性网状细胞瘤、矮小综合症以及慢性淋巴瘤及其它组织的肿瘤^[1]。

20世纪70年代, MD和AL的鉴别诊断是根据临床表现、鸡群的历史和眼观病变进行综合判定, 因为那时MD主要是9周龄以上鸡的疾病, 其特征是外周神经病变及其相应麻痹症状; 而淋巴白血病 (LL) 则

发生在成年 (一般在16周龄以上) 的种鸡和商品蛋鸡, 引起内脏器官的淋巴样肿瘤^[1,2]; 根据肿瘤发生的部位, RE则有囊型和非囊型之分, 前者主要出现在肝和法氏囊, 这与LL的肿瘤很难区别, 后者的肿瘤主要发生在胸腺、心、肝、脾中, 也有神经肿大, 这在外表上又与MD肿瘤很相似。在显微组织病变上, MD肿瘤组织有多形细胞浸润, LL则有一致的胚型细胞浸润, 而RE有大小一致的未分化的大型网状细胞浸润。这些细胞水平上 (形状和大小) 的细微差异, 需要专门的训练及经验才能鉴别。依上所述, MD、AL、RE引起的肿瘤虽在某些方面有区别, 但在实际诊断工作中, 准确的判断需要丰富的经验, 而且这种方法具有较大的主观性。可使感染鸡早期 (4~8周龄) 发生肿瘤的ALV-J亚型于90年代初的出现, 也使MD和AL的发病年龄界限的差别变得不明显。这样使MD、AL、RE的现场鉴别诊断复杂化。

此外, 由于MDV、ALV和REV感染所致的免疫抑制是这些疾病的一种主要的表现形式, 特别是在出现明显的肉眼可见病变之前^[3]。因此, 寻找一种更

2000-06-22收稿, 2000-09-06修回。

* 广西九五科技攻关项目资助 (桂科攻9911043)。

为敏感的替代方法用于肿瘤病的诊断是非常必需的。

病毒的分离和鉴定通常能使疾病得到确诊,但是病毒分离所需的时间太长,通常为1~2周,且MDV为严格细胞结合性病毒,病毒分离的体外培养条件要求较高,而且在鸡胚成纤维细胞(CEF)上5d~14d才呈现典型的蚀斑;用于病毒鉴定的免疫荧光是敏感的,但MDV抗体不能区分疫苗株和强毒株^[4];ELISA^[5,6]、免疫过氧化物酶^[7]和免疫荧光^[8]等血清学方法是相当简单的生物学方法,可达到区分MDV、REV、ALV的目的,但检测前均需要经过病毒的分离和大量繁殖;原位杂交法^[9]、限制性内切酶分析法^[10]都具有较高的特异性,但也不能用于MDV强弱毒株的鉴别;核酸探针特异性较高,能区分MDV强弱毒株,但该方法操作步骤繁杂,结果的判定带有一定的主观性

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)与传统的诊断方法相比,PCR技术具有快速、敏感、特异的特点,因此该技术已被广泛应用于生命科学的各个领域,包括病原鉴定、疫病诊断、流行病学调查等,人医已将其作为一个标准的诊断程序。在家禽病毒性肿瘤病的鉴别诊断上,国内外各学者也尝试使用这一技术,并取得一些进展,本文将概述PCR对MD、AL、RE进行诊断的进展

1 PCR用于MDV的鉴定

MDV可分为3个血清型:血清I型(MDV-1)包括致瘤的强毒株和不致瘤的弱毒株,血清II型(MDV-2)和III型(MDV-3)均为自然弱毒株,无致瘤性。该病除引起病禽死亡、生产性能下降等损失外,还造成广泛的免疫抑制,给养禽业造成巨大损失^[3]。

1.1 MDV的基因组特点^[4,11,12]

MDV的DNA为线性双股分子,含有一长独特区(UL)和一短独特区(US),每一区域都与反向重复序列(TR、IR)相连。DV基因组编码多种病毒特异性的蛋白质抗原,编码分泌性糖蛋白gA的多肽前体基因位于UL区的BamHI-B片段上,该序列有一部分是比较保守的;编码非分泌性糖蛋白复合物gB的基因位于UL区中部BamHI-K和I两个相邻片段,其含包的开放阅读框(ORF)两端负责启动和终止转录的序列十分保守;在BamHI-H片段(位于IRL)或BamHI-D片段(位于TRL)内有一个132个碱基对序列的同向重复区(132-bpr)与病毒的致癌性相关,该区有很强的转录活性,在致癌性很强的MDV毒株上这一序列只有2~3个重复,但是在细胞培养上连续传代后,随着病毒毒力的减弱,132-bpr的拷贝数可增

至4~5个或更多一些^[13]。之后拷贝数差异被认为是区分MDV强弱毒株的一个重要标志;与致瘤有关的还有pp38基因和Meq基因,pp38基因位于基因组BamHI-H片段中部病毒复制原点的左侧,其表达产物是肿瘤细胞系中唯一能检出的特异性抗原,现初步证实它与病毒免疫抑制有关^[14];Meq基因位于MDV基因组BamHI-I片段及与此片段重叠的EcoQ片段,仅在MDV-1中存在,能在转化细胞中表达。目前认为它对病毒潜伏状态(Latency)有控制作用,而且认为它属于转录激活因子(transactivator)^[15~17]。最近,磨美兰^[18]通过对各致病型(pathotype)毒株Meq基因序列的比较研究,发现了一个强毒株特有的标记。这一发现的意义有待于进一步的研究

1.2 MDV鉴别诊断PCR引物的选择

目前,Silva^[19]设计的针对于132-bpr的PCR引物被广泛应用于MDV强毒和弱毒的区分以及MDV与ALV、REV引起的肿瘤的鉴别。其引物序列为:(正)TGC GAT GAA AGT GCT ATG GAG G 3'(22bp), (反)5'GAG AAT CCC TAT GAG AAA GCGC 3'(22bp)。Silva^[19]用该PCR系统,成功地鉴别了MDV-1的致瘤株和非致瘤株,而ALV和REV都为阴性;最近Witter等^[20]用该PCR系统成功地诊断出3周龄鸡发生的高毒力MDV引起的短暂麻痹,而ALV为该PCR系统阴性;Davidson等^[21]运用针对132-bpr的另一对引物也成功地鉴别诊断MDV和REV引起的肿瘤病,并证实以132-bpr为基础的PCR能确诊野毒株和鉴别致瘤的以及非致瘤的MDV,并证实从肿瘤中提取的DNA所进行的PCR是比较有效的,但为了获得更准确的结果,血液样品也应作为提取DNA的来源。卢春^[22]等也通过该办法对鸡的血液和羽囊样品进行检测,区分了MDV-1的强弱毒株,而MDV-2、MDV-3和REV通过该PCR系统扩增时为阴性,该实验表明该PCR系统具有高特异性、快速、敏感的特点

Fukuchi^[23]和Maotan^[24]等报道132-bpr与MDV致病力有关,但没有足够的证据说明132-bpr的改变对致病性的作用机理;Young^[13]用MDV-1型的弱毒株和疫苗株对鸡进行接种,发现其132-bpr在传代后丧失,对接种鸡的血液样品的DNA进行MDV-PCR扩增时发现只有1~2个重复序列;而Hooft Van Id-dekinge^[13]用Silva设计的引物对MDV传代细胞进行PCR扩增,发现132-bpr拷贝数的增加与其毒力降低并不完全一致,在132-bpr增宽的MDV-1型株仍保持相当毒力。因此,依赖于132-bpr拷贝数的PCR方法只能区别细胞适应株和未经培养的病毒,而不能区

别致病和非致病的 MDV-1 的毒力, 但这对于鉴别细胞培养生产的疫苗株及野毒株已很有效

针对于 MDV 的 DNA 基因组中 gA 基因的特点, 卢春^[25]等运用针对于 MDV gA 中一段较为保守序列的引物检测出发病鸡血液白细胞中的 MDV 的存在; Young 等^[26]建立的巢式 PCR 通过对 gA 部分序列的扩增, 也可检出一滴血中的 MDV; 陈茹等^[27]合成了 MDV-1 特异的 gA-引物, 用于免疫监测。

Silva 和 Witter^[28]合成了针对于 gB 基因的特异引物, 其 PCR 结果证实, PCR 阳性与组织病变有很好的相关性, 并认为, 将类似于 MD 肿瘤的 AL 和 RE 与 MD 区分开, PCR 是一种最简单和敏感的方法

2 PCR 用于 ALV 的鉴定

白血病是由 ALV 各亚型 (A, B, C, D, E) 病毒所致的多种肿瘤性疾病的统称, 其中以淋巴细胞性白血病 (LL) 多见^[29]。1991 年又出现了一种由 ALV-J 株引起的成髓细胞白血病^[30], 该株 ALV 主要侵害商业肉鸡群, 引起成髓细胞白血病和其它多种肿瘤。

2.1 ALV 的基因组特点

ALV 的核酸是 RNA, 从 5' 到 3' 端的 RNA 分子是 gag-pol-env 基因, gag 基因编码非糖基化蛋白质, pol 基因编码反转录酶和 p32 (一种核酸内切酶), env 基因主要编码 gp85 和 gp37 两种糖蛋白, gp85 决定病毒的亚群特异性。ALV 感染宿主后, 以前病毒 DNA 的形式整合进宿主染色体 DNA 的 c-myc 基因位点, 然后在长末端重复序列 (LTR) 启动子序列的影响下该基因被大量表达, 开始淋巴瘤的形成过程^[29]。前病毒 DNA 两端的 LTR 各包含 3 个区域, 即 3' 独特区 (U3) R 区 (高度保守的含 21bp 的区域) 和 5' 独特区 (U5)^[31]。新发现的 ALV-J 株也与其它外源性 ALV 一样, 不具有致癌基因, 感染细胞被转化 (肿瘤发展) 是间接通过插入突变而引起宿主细胞原癌基因 (proto-oncogene) c-myc 的活化。

2.2 PCR 引物的选择及应用

Silva^[31]认为要将内源性 ALV 与外源性 ALV 区分开, 所用的针对外源性 ALV 的 PCR 正向引物应设计在劳斯肉瘤病毒 (RSV) LTR U3 区的一个 CArG 框内退火, 这一区域在内源性 ALV 基因组中没有, 反向引物设计在 U5 区域内, 扩增出的片段应为 220bp, 其引物序列为: (正) 5' AAG TAA GGT TAC GAT CGT GCC TTA 3' (24bp), (反) 5' CTG CTT CAT TCA GGT GTT CGC AAT 3' (24bp), 该引物不能用于扩增 RAV-O 和 ALV-J 感染的细胞 DNA。Davidson^[21]利用 Smith 设计的引物成功地扩增了引

起肿瘤的外源性 ALV 前 DNA 的目的基因, 其序列为: (正) 5' AAG TAA GGT GGT ACG ATC GTG 3' (21bp), (反) 5' CTG CTT CAT TCA GGT GTT CGC AAT 3' (24bp), 对 10 个血液样品和 8 个肿瘤样品的扩增结果表明, 肿瘤样品比血液样品检出率高, 但为了获得准确的结果, 两者都应作为提取 DNA 来源。

对于新出现的 ALV-J 株引起的肿瘤病, 目前已建立了针对于 ALV-J 的特异的 PCR 检测方法, 它能用来检测存在于肿瘤及感染组织中和细胞培养物上的前病毒 DNA。在 L. M. Smith 等^[32]建立的方法中, 他们从 pol 基因选取一段作为上游引物, 从 env 基因选取一段作为下游引物, 可检测到 ALV-J 的前 DNA, 但这种方法必须注意排除内源性 EAV 的干扰。E. J. Smith 等^[30, 33]所用的 PCR 引物是由前病毒 DNA 3' 端的 E 序列到 5' 端的 LTR 的末端组成, 其序列为: (正) 5' AAT TCT GCT TGA AAT ATG 3' (18bp), (反) 5' AGT TGT CAG GGT ATC GAC 3' (18bp), 用于扩增不常见的 E 成分和 LTR 高度保守的独特 5' 区, 结果表明, 该 PCR 系统对 ALV-J 前病毒是特异、敏感的, 只有来源于 ALV-J 的 5 个现地分离株和 Prague C RSV 感染 CEF 的 DNA 才扩增出与原型株大小相同的产物, ALV 其它亚型、REV 和未感染 O 系不发生反应, 该引物可用于扩增血液、趾和鸡冠样品中的 DNA。

3 PCR 用于 REV 的鉴定

REV 的最初分离物 T 株是 198 年从患内脏淋巴瘤的火鸡中分离出来的^[1]。目前组成 REV 群的反转录病毒包括不完全复制 T 株 (REV-T), 有复制活性的 REV-A 脾坏死病毒 (SNV) 和鸡合胞体病毒 (CSV)。

3.1 REV 的基因组特点

REV 的基因组结构与 ALV 的基因组结构相似。REV 感染宿主后缺陷型 REV-T 前病毒致癌基因 v-rel 整合入宿主 DNA, 转化靶细胞; 完全型 REV 基因组无 v-rel, 但其 LTR 具有强启动子作用, 当前病毒 DNA 整合到宿主原癌基因 c-myc 附近时, 就可启动原癌基因的表达和细胞转化^[34]。

3.2 PCR 引物的选择及应用

用于 REV 检测的 PCR 引物来源于 SNV 的 LTR, 预期扩增的片段长度为 291bp, 扩增的序列包括整个 U5, R 重复序列和 U 的 118bp, Aly^[35]等通过实验证实, 该 PCR 系统比 ELISA 核酸探针至少敏感 10 倍, 该 PCR 系统能从囊淋巴瘤和非肿瘤脑组织

中检出 REV, 而已知的 ALV MDV 引起的肿瘤 DNA 不能被扩增, 其所设计的引物序列为: (正) 5' CAT ACT GGA GCC AAT GGT GTA AAG GGC AGC 3' (30bp), (反) 5' AAT GTT GTA GCG AAG TAC T 3' (19bp), 在试验中, REV 的其它毒株用该 PCR 系统扩增后所产生的 PCR 产物与 SNV-LTR PCR 产物有相同的特征。Davidson 等^[21]以 Aly 所设计的引物为基础, 在以色列成功地鉴别诊断了由 REV 和 MDV 引起的鸡和火鸡的肿瘤病, 实验结果表明, 对于检测由 REV 垂直传播引起的病例和早期感染病例, 该 PCR 系统也是很敏感的, 作者认为, Aly 所设计的该 PCR 引物可以全球通用, 同时他运用该 PCR 系统鉴别诊断 RE MD 和 AL, REV 检出率为: 血液 25%、肿瘤组织 24%^[21]; Fadly^[36]通过该 PCR 系统检出由于商品鸡痘苗污染有 REV 而引起的肉鸡肿瘤病。

Davidson^[37]用 5 株非缺陷 REV 和 1 株复制缺陷 REV 对 6 日龄鸡胚进行卵黄囊接种, 用 PCR 检测 REV 前病毒在各组织中的复制整合情况, 结果表明不同株及同株在不同鸡胚组织间的复制都有差异, 肝和脾是最普遍的受害部位, 由于 REV 前病毒的整合作用, PCR 阳性鸡并不一定出现病毒颗粒。

4 PCR 法应用于 MDV REV 和 ALV 引起的肿瘤病的鉴别诊断的前景

PCR 技术是一种很敏感分子生物学方法, 因此有可能会检出普遍存在于自然界的 MDV ALV 和 REV^[19], 因而可能会导致肿瘤检查的假阳性 Silva 和 Witter^[28]发现某些已感染 MDV 而没有淋巴瘤生成的病鸡的 PCR 检测结果也为阳性 此外, 现场患肿瘤病的鸡可能是致癌病毒多重感染的, 因此, 不能将某一 PCR 阳性病鸡统诊为单一的相应的疾病。Witter^[38]长期的研究表明, MDV ALV 和 REV 都在不断进化着, 因此推测, 目前的 PCR 系统可能适应不了某些新出现的毒株 ALV 的 PCR 容易受内源 EAV 的干扰, ALV-J 分离物容易快速变异, 因此, 设计多对引物序列作 PCR, 对检测所有病毒变异株是必要的。REV ALV 与 MDV 间的整合作用^[21, 37]也许会影响 PCR 的检测, 因为这种整合有可能会影响 MDV 的生长和致癌作用。而且 Isfort 等^[39]证实, REV 具有调控活性的 LTR 插入 MDV 基因组的 BamHI-D 片段的 132-bpr 附近, 可使 MDV 基因组中的这种插入序列与天然 REV-LTR 有 98% 的一致性, 个别野毒株也显示出与 REV-LTR 的同源序列。Ewert^[40]已证实, MDV 某些毒株能增强 ALV 的致癌作用, MDV

对 ALV 前病毒的反式激活, 使 ALV 和 MDV 双重感染比 ALV 单独感染所致的 LL 发病率高^[41]。因此, 以上这些问题是我们对 PCR 的结果进行分析时所应予以考虑的。

PCR 虽然尚存在一些问题, 但以上各学者的成功经验告诉我们, PCR 法仍然是目前鉴别诊断家禽病毒性肿瘤病最有效的最快捷方法之一。

参考文献

- 1 卡尔尼克 B W 主编. 禽病学. 高福译. 第 9 版. 北京: 北京农业大学出版社, 1991.
- 2 周宗清译. 鸡马立克氏病的研究现状 I 国外畜牧学——猪与禽, 1999, (3): 56~ 59.
- 3 韦平, 丁家波. 几种引起家禽免疫抑制的病毒性疾病及其作用机理. 中国预防兽医学报, 2000, 22(4): 316~ 318.
- 4 崔治中. 马立克氏病病毒感染和致癌作用的分子生物学. 中国兽医学报, 1995, 5(3): 306~ 312.
- 5 单松华, 陈溥言, 蔡宝祥. 马立克氏病两种诊断方法的建立和应用. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 92~ 98.
- 6 黄进, 陈德威, 张冰等. 应用 ELISA 和 AGP 检测鸡白血病毒病的比较. 中国兽医杂志, 1996, 22(6): 6~ 7.
- 7 Silva R F, Calvert J G, Lee L F. A simple immunoperoxidase plaque assay to detect and quantitate Marek's disease virus plaques. Avian Diseases, 1997, 41: 528~ 534.
- 8 吕昌林, 高登慧. 鸡马立克氏病荧光抗体的制备及其在诊断中的应用. 畜牧与兽医, 1992, 24(6): 247.
- 9 Arshad S S, Smith L M, Howes K et al. Tropism of subgroup J avian leukosis virus as detected by in situ hybridization. Avian Pathol, 1999, 28(2): 163~ 169.
- 10 Silva R F. 应用马立克氏病病毒 DNA 限制性内切酶分析鉴定病毒株及传代代次. 国外兽医学——畜禽传染病, 1992, 12(4): 36.
- 11 罗满林, 蔡宝祥, 陈溥言. 马立克氏病病毒的分子生物学研究进展. 中国病毒学, 1994, 9(2): 87~ 92.
- 12 宁晓檬, 粟穗良. 马立克氏病病毒分子生物学研究进展. 中国畜禽传染病, 1995, (1): 58~ 61.
- 13 Hooft van Iddeking, Stenzler B J L, Schat K A et al. Genome analysis of Marek's disease virus strain CV I-988 effect of cell culture passage on the inverted repeat regions. Avian Diseases, 1999, 43(2): 182~ 188.
- 14 Cui Z, Lee L F. Construction of a recombinant CV I988 strain expressing virulent epitope on 38KD phosphorylated protein of Marek's disease virus. XI International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Budapest, 1997, 32.
- 15 Liu J L, Lee L F, Ye Y et al. Nucleolar and nuclear localization properties of a herpesvirus bZIP oncoprotein MEQ. J Virol, 1997, 71(4): 3188~ 3196.
- 16 韦平, Lee Lucy F. 利用重组反转录病毒表达马立克氏

- 病病毒 Meq 基因. 中国兽医学报, 1999, 19 (2): 105-108.
- 17 韦平, Lee Lucy F. 应用杆状病毒载体在昆虫细胞表达 马立克氏病病毒 Meq 基因. 中国兽医学报, 2000, 20 (3): 211-215.
 - 18 磨美兰. 马立克氏病病毒强毒株一个遗传标记的发现. 广西农业生物科学, 19 (2): 93.
 - 19 Silva R F. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype I Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome. Avian Diseases, 1992, 36 (4): 521-528.
 - 20 Witter R L. An acute form of transient paralysis induced by highly virulent strains of MDVs. Avian Diseases, 1999, 43 (4): 704-720.
 - 21 Davidson Irit, Borovskaya Anya, Perl L et al. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol, 1995, 24 (1): 69-94.
 - 22 卢春, 陈溥言, 蔡宝祥. 多聚酶链反应区分血清 I 型 MDV 强弱毒株. 中国兽医学报, 1996, 16(3): 248-251.
 - 23 Fukuchi K, A Tanaka, L W. Schierman et al. The structure of Marek's disease virus DNA the presence of unique expansion in non-pathogenic viral DNA. Proc Natl Acad Sci, 1985, 82 751-754.
 - 24 Maotani K, A Kanamori, K Ikuta et al. Amplification of a tandem direct repeat within inverted repeats of Marek's disease virus DNA during serial in vitro passage. J Virol, 1986, 58 657-660.
 - 25 卢春, 姜平, 陈溥言等. PCR法检测血清 I 型马立克氏病病毒及其敏感性试验的研究. 中国畜牧传染病学, 1996, (3): 10-12.
 - 26 Young P, Gravel J. Rapid diagnosis of Marek's disease virus in blood and other tissues using PCR. In Silva R F et al. Current Research on Marek's Disease, East Lansing, Michigan, 1996. 308-310.
 - 27 陈茹, 吴时清, 林志雄等. 应用 PCR 技术快速鉴别诊断马立克氏病病毒并进行免疫效果监测. 中国畜牧兽医学禽病学分会第五届委员代表大会暨第九次学术研讨会论文集, 1998. 26-29.
 - 28 Silva R F, Witter R L. Correlation of PCR detection of MDV with the appearance of histological lesions. In Silva R F et al. Current Research on Marek's Disease, East Lansing, Michigan, 1996. 306-320.
 - 29 甘永华. 鸡淋巴细胞性白血病的研究进展. 中国兽医科技, 1996, 26 (9): 22-25.
 - 30 Payne L N. 肉用鸡骨髓细胞白血病的出现. 北京国际禽病会议暨展览会论文集, 1999, 302-306.
 - 31 Silva R F. PCR as a tool for the diagnosis of avian tumor viruses and tumors. Avian Tumor Viruses Symposium, 40th Annual Meeting Reno, Nevada, 1997, 19-22.
 - 32 秦爱建. 禽白血病病毒丁亚群囊膜糖蛋白基因的生物化学和生物化学特性 [博士学位论文]. 扬州大学, 1999.
 - 33 Smith E J, Williams S M, Fadly A M. Detection of avian leukosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction. Avian Diseases, 1998, 42 (2): 375-380.
 - 34 匡宝晓, 徐福南. 禽网状内皮组织增殖病. 中国兽医科技, 1997, 27 (4): 19-21.
 - 35 Aly M M, Smith E J, Fadly A M. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. Avian Pathol, 1993, 22 (4): 543-554.
 - 36 Fadly A M, Witte R L, Smith E J et al. An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol, 1996, 25 (1): 25-47.
 - 37 Davidson Irit, Pnat Alphandary, Mina Novoseler et al. Replication of non-defective reticuloendotheliosis viruses in the avian embryo assayed by PCR and immunofluorescence. Avian Pathol, 1997, 26 (4): 579-593.
 - 38 Witter R L. Avian tumor viruses persistent and evolving pathogens. Acta Veterinaria Hungaria, 1997, 45 (3): 251-266.
 - 39 Isfort R J, Qian Z, Jone D et al. Integration uses herpesviral gD as a common target of integration. Virology, 1994, 203 125-133.
 - 40 Ewert D L, DuHadaway J, Fadly A. Serotype 2 Marek's disease virus promotes metastasis of avian leukosis virus transformed B cells. In Silva R F et al. Current Research on Marek's Disease, East Lansing, Michigan, 1996. 341-346.
 - 41 Venugopal K, Payne L N. Molecular pathogenesis of Marek's disease recent developments, Avian Pathol. 1995, 24 (4): 597-609.

(责任编辑: 邓大玉)