

## 鸡肿瘤病快速鉴别诊断试剂盒及其应用研究\*

## Kit for Rapid Differential Diagnosis of Avian Tumors and Its Applications

韦平<sup>1</sup>,何秀苗<sup>2</sup>,王桂军<sup>3</sup>,李康然<sup>1</sup>,蒋玲艳<sup>1</sup>,李莉萍<sup>1</sup>,阳秀英<sup>1</sup>,慕朝师<sup>4</sup>Wei Ping<sup>1</sup>, He Xiumiao<sup>2</sup>, Wang Guijun<sup>3</sup>, Li Kangran<sup>1</sup>, Jiang Lingyan<sup>1</sup>, Li Liping<sup>1</sup>, Yang Xiuying<sup>1</sup>, Mu Chaoshi<sup>4</sup>

(1.广西大学养禽与禽病研究所,广西南宁 530005; 2.广西民族学院,广西南宁 530006; 3.安徽农业大学动物科技学院,安徽合肥 230036; 4.广西科技情报所,广西南宁 530022)

(1. Institute for Poultry Sci. &amp; Health, Guangxi Univ., Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. Guangxi Univ. for Nationality, Nanning, Guangxi, 530006, China; 3. Coll. of Animal Sci. and Tech., Anhui Agri. Univ., Hefei, Anhui, 230036, China; 4. Guangxi Institute for Sci. and Tech. Information, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:** 建立快速鉴别诊断鸡肿瘤病的聚合酶链式反应技术并研制成配套的诊断试剂盒。应用该试剂盒及其配套的操作程序,在 2000年 5月~ 2004年 7月检测来源于广西 6个地区 202个禽群共 685羽病、死鸡和火鸡的肿瘤和可疑肿瘤组织病料以及来源于安徽省不同地区的 46个鸡群的疑似肿瘤病、死鸡 305羽;同时,检测广西、安徽、山东、河南主要养鸡地区临床表现为生长缓慢、消瘦、贫血、疫苗免疫应答不佳、发病率和死亡率偏高等疑为免疫抑制状态的 154个鸡群中的 644羽病、死鸡。结果,在肿瘤和可疑肿瘤病料的检测中, 马立克氏病、网状内皮增生症和禽白血病的阳性率分别为 57.17%、11.84% 和 5.47%, 其中二重、三重混合感染总检测率为 16.25%。在疑似免疫抑制性疾病病料的检测中, 3种鸡肿瘤病的阳性率分别为 28.26%、7.43% 和 4.19%, 其中二重、三重肿瘤病以及与其它免疫抑制性疾病的混合感染率达 35.92%。建立的鸡肿瘤病快速鉴别诊断程序及试剂盒, 操作简便快捷, 结果准确可靠, 保存方便, 检测成本低, 适用于临床鸡肿瘤病的鉴别诊断, 对鸡肿瘤病的流行病学调查、免疫抑制病检测以及兽医检疫有重要价值。

**关键词:** 鸡肿瘤病 鉴别诊断 聚合酶链式反应 核酸探针 试剂盒 免疫抑制性疾病 混合感染 应用中图分类号: S854.44 S858.31 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2005)01-0062-06

**Abstract** Marek's disease (MD), reticuloendotheliosis (RE) and avian leukosis (AL) are the most common tumors in chickens. A rapid differential diagnosis protocol and a detection kit for avian tumors, which based on multiplex PCR technique was developed. Tumor/suspect tumor samples of 685 chickens and turkeys from 202 flocks in Guangxi and samples of 175 chickens from 38 flocks in Anhui were detected by using the diagnosis kit and the protocol. And 644 chickens from 154 flocks with immunosuppressive diseases collected from Guangxi, Anhui, Henan and Shandong were also detected. MD was the most common tumor in the survey (57.17% and 28.26% positive of the birds with tumors and immunosuppressive diseases, respectively); RE was the second common one (11.84% and 7.43%, respectively) and then was AL (5.47% and 4.19%, respectively). Dual, triple and multiple infections were common in the birds detected (16.25% and 35.92% positive of the birds with tumors and immunosuppressive diseases, respectively). The results demonstrated that our detection kit and the protocol was a simple, rapid, inexpensive and reliable tool for the differential diagnosis of avian tumors. They will play an important role in epidemiological investigation, detection of vaccine contamination with REV and ALV, and veterinary quarantine for avian tumors and immunosuppressive diseases.

**Key words** avian tumors, differential diagnosis, polymerase chain reaction, DNA probe, detection kit, immunosuppressive diseases, multiple infections, application

收稿日期: 2005-01-04

修回日期: 2005-01-17

作者简介: 韦平 (1962-), 男, 广西南宁人, 博士, 教授, 主要从事家禽与鸟类疾病及其病原分子生物学的研究。

\* 广西九·五科技攻关项目 (991104)、广西“十百千人才”工程基金项目 (99215)、教育部科研重点项目 (02116) 和江苏省高校重点实验室开放课题 (KJS01057) 资助。

鸡最常见而且危害最大的肿瘤病是马立克氏病 (Marek's disease, MD)、禽白血病 (avian leukosis, AL)和网状内皮增生症 (reticuloendotheliosis, RE),它们分别由致瘤性病毒 MDV、ALV 和 REV 引起,除了使鸡发生肿瘤而死亡外,还可使感染禽的免疫功能受到损害,引发整个鸡群的免疫抑制状态,造成更大的经济损失<sup>[1]</sup>。多位学者的研究表明,MD、RE和 AL 在我国养鸡业中均有不同程度的存在<sup>[2~4]</sup>。混合感染现象的存在使常规的病理组织学方法难以进行鉴别,病毒的分离和鉴定方法所需要的时间太长、费用大,已不适应当前养禽业生产和科研的需要。因此,要有效预防和控制肿瘤病对养禽业的危害,必须探索一种简便、快捷、特异、敏感,能准确区分 MDV、ALV 和 REV 的鉴别诊断新方法。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)作为一种体外扩增技术<sup>[5]</sup>,已广泛应用于禽病诊断。为了将这一技术有效应用于肿瘤病的鉴别诊断,何秀苗等<sup>[6]</sup>、王桂军等<sup>[3,7]</sup>、韦平等<sup>[8]</sup>先后对 PCR 技术应用于鸡肿瘤病快速鉴别诊断的国内外研究动态、快速鉴别诊断技术,包括多重 PCR 诊断技术的建立、操作程序及反应条件的优化、诊断技术的特异性和敏感性试验,配套的诊断试剂盒的研制开发与应用、与核酸探针检测方法的比较等进行了全面的研究,这对于临床禽病的类症鉴别提供方便、可靠的诊断具有重要的实用价值。为了使这些技术更好地服务于生产,我们应用研制开发的快速鉴别诊断试剂盒及其配套的操作程序,在广西、安徽等省的肿瘤或可疑肿瘤组织的诊断中应用,应用结果显示,该试剂盒的快速、特异、灵敏和准确的特点,将试剂盒扩大应用于免疫抑制性疾病的鉴别诊断,更显示其在混合感染方面具有独特的优势和很高的实用价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 参考病毒株及其 DNA 样品

MDV-1 的 GA 株 (强毒型, vMDV)、648A 株 (特超强毒型, vv+ MDV)、CV 1988/Rispens 株 (弱毒型, mMDV) 的 DNA 以及 REV、ALV 前病毒 DNA 参考样品,均由山东农业大学崔治中教授提供。MDV-1 的广西分离株 N2 (超强毒型, vvMDV) 以及作为阴性对照的 5 种其它禽病病原,即大肠杆菌 (*E. coli*)、传染性支气管炎 (IBV)、呼肠孤病毒 (ReoV)、传染性喉气管炎 (ILT) 和新城疫病毒 (NDV) 的核酸抽提样品 (其中 *E. coli* 为 DNA, 其它为总 RNA), 为本所制备并保存。

### 1.2 试剂盒及其主要试剂

试剂盒主要包括: Taq DNA 聚合酶、针对 3 种肿

瘤病 PCR 引物<sup>[7]</sup>、10× PCR Buffer、25mM MgCl<sub>2</sub>、10mM dNTPs, 均购自上海 Sangon 公司, 置 -20℃ 保存; DNA 抽提液<sup>[3]</sup>由本所配制, 置 4℃ 保存。

### 1.3 PCR 快速鉴别技术的建立及指标测定

#### 1.3.1 PCR 引物设计

根据 MDV、REV 和 ALV 的病毒特性, 确定以 MDV 的 *I32-bpr* 及 ALV 和 REV 的 *LTR* 作为 PCR 扩增的特异性基因片段<sup>[8]</sup>。根据引物设计原则和三重 PCR 的要求, 设计可同时扩增 MDV、ALV 和 REV 的 3 对特异引物<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 方法建立

以 PCR 技术为基础, 能快速鉴别 MD、AL 和 RE 的诊断技术为目标。三重 PCR 的扩增条件参照何秀苗等<sup>[9]</sup>的程序进行。整个扩增反应共需约 2h。

#### 1.3.3 特异性试验和敏感性试验

参见韦平等<sup>[8]</sup>的方法进行。

### 1.4 临床病料的采集及检测

收集临床上病鸡或死鸡的肿瘤和可疑肿瘤组织样品和疑似免疫抑制性疾病的病鸡或死鸡, 主要采集易获得的肝、脾、胸腺、骨髓和腺胃等组织器官, 置 -20℃ 保存备用或直接用于核酸的抽提。样品总 DNA 的抽提参照韦平等<sup>[8,10]</sup>改进后的方法进行, PCR 反应的条件和参数参见韦平等<sup>[8]</sup>的方法进行。

#### 1.4.1 鸡肿瘤病的检测

在 2000 年 5 月~2004 年 4 月期间, 用快速鉴别诊断技术及其试剂盒分别对广西主要养禽地区南宁、玉林、桂林、钦州、柳州、北海等地 201 个鸡群的 683 羽肿瘤疑似病、死鸡共 2000 多份的肿瘤样品以及安徽省主要养禽地区合肥、安庆、巢湖、淮北、阜阳等地 46 个鸡群的肿瘤疑似病、死鸡 305 羽, 共 1000 多份的肿瘤样品进行检测。

#### 1.4.2 免疫抑制性疾病的检测

在 2002 年 8 月~2004 年 7 月期间, 应用肿瘤病诊断试剂盒及针对鸡传染性贫血病毒 (chicken infectious anemia virus, CIAV)、传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 和呼肠孤病毒 (reovirus, ReoV) 感染的诊断技术<sup>[11~13]</sup>, 分别对广西、安徽、山东、河南的 154 个鸡群中临床表现为生长缓慢、消瘦、贫血、疫苗免疫应答不佳、发病率和死亡率偏高等疑为免疫抑制状态的 644 羽病、死鸡进行检测。用于检测的样品为骨髓、胸腺、肝、脾和法氏囊组织, 共 1500 多份。

### 1.5 三重 PCR 方法的建立

将各反应条件进行优化, 在上述 PCR 反应程序中实现 3 种肿瘤病能同时在一个 PCR 反应中进行检出和区别为目的, 具体方法参照文献 [8, 10]。

## 1.6 检测结果的分析

分别对各种肿瘤病及其混合发生的阳性率、各种肿瘤病在总阳性病例中的比例、不同器官各肿瘤病的检出率,以及肿瘤病与临床上其它免疫抑制性疾病的关系等进行分析 and 统计。

## 1.7 诊断试剂盒保存期的测试

为了方便诊断试剂盒在基层的应用与推广,研究还对诊断试剂盒的主要试剂如 DNA 抽提液、Taq 聚合酶、引物等分别在室温(20°C左右)和-20°C下的保存时间进行测试。配制后每个月测1次。

## 1.8 PCR和核酸探针技术比较

应用 PCR技术与核酸探针点杂交技术(探针为山东农业大学崔治中教授惠赠),分别对105份和70份临床鸡肿瘤或可疑肿瘤病料进行 MD和 RE对比检测,比较两种技术的准确性、特异性、敏感性、费用、时间等。具体方法参见文献[14]的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 PCR快速鉴别技术建立及指标测定结果

#### 2.1.1 建立的方法及其结果判定

对3种鸡肿瘤病 PCR扩增的模板均为 DNA,可直接取病料样品提取的总 DNA 进行检测,无须对 REV 和 ALV 反转录病毒进行反转录,使诊断达到方便、快捷。由于3种病毒基因组在肿瘤和溶细胞感染时的含量明显升高并被 PCR技术检测出来<sup>[15]</sup>,因此,当从肿瘤等样品中检测到某个病毒的特异性基因产物时即可判定为由该病毒引起的肿瘤。

#### 2.1.2 特异性试验结果

用建立的上述诊断方法从 MD阳性样品中仅扩增出特异的 132-bpr 基因,其产物主要为 317 bp 的片段(含2个拷贝),而从 ALV阳性样品中扩增出 220 bp 目的产物,同样从 RE阳性样品中扩增出 291 bp 目的产物,但对另2种肿瘤病样品的扩增结果则均为阴性(见图1),显示了3对引物的特异性。

#### 2.1.3 敏感性试验结果

3种鸡肿瘤病可检测的总 DNA 最低为  $3.4 \times 10^{-7} \sim 6.0 \times 10^{-4} \mu\text{g}$

### 2.2 三重 PCR方法的检测结果

对各种引物的用量、比例以及反应的条件和参数等因素进行优化后,能够一次 PCR可同时对3种病原进行扩增。结果见图2所示。不仅节约了时间和成本,而且快速、敏感。



图1 3种鸡肿瘤病之间特异性扩增电泳结果

Fig. 1 Results of PCR specificity test among avian tumors

1. CV I988 (MD 引物); 2. CV I988 (ALV 引物); 3. CV I988 (RE 引物); 4. MD 阳性样品 (MD 引物); 5. MD 阳性样品 (ALV 引物); 6. MD 阳性样品 (RE 引物); 7. pUC19DNA Msp1 (Hpa2) Marker; 8. RE 阳性样品 (RE 引物); 9. RE 阳性样品 (MD 引物); 10. RE 阳性样品 (ALV 引物); 11. ALV 阳性样品 (MD 引物); 12. ALV 阳性样品 (ALV 引物); 13. ALV 阳性样品 (RE 引物)。

1. CV I988 (MD primers); 2. CV I988 (ALV primers); 3. CV I988 (RE primers); 4. MD post. (MD primers); 5. MD post. (ALV primers); 6. MD post. (RE primers); 7. pUC19DNA Msp1 (Hpa2) Marker; 8. RE post. (RE primers); 9. RE post. (MD primers); 10. RE post. (ALV primers); 11. ALV post. (MD primers); 12. ALV post. (ALV primers); 13. ALV post. (RE primers)。

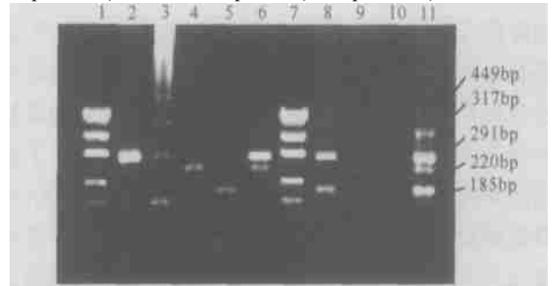


图2 鸡肿瘤病三重 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig. 2 Results of triple PCR test for avian tumors

1, 7. pUC19DNA Msp1 (Hpa2) Marker; 2. GA; 3. CV I988; 4. REV; 5. ALV; 6. REV+ MDV; 8. MDV+ ALV; 9, 10. REV+ ALV; 11. MDV+ REV+ ALV.

### 2.3 鸡肿瘤病诊断盒保存期的测试结果

测试结果表明, DNA 抽提液在室温(20°C左右)下保存 0~24 个月, Taq 聚合酶在 -20°C 下保存 0~15 个月,其使用效果均未受影响;引物在稀释和未稀释状态下 -20°C 分别保存 0~12 个月和 0~27 个月仍保持扩增效果不变。

### 2.4 鸡肿瘤病快速鉴别诊断技术及其试剂盒的检测应用结果

#### 2.4.1 对鸡肿瘤病流行病学的检测应用结果

从表1表2可知, MD 仍然是广西、安徽两省区当前最常见的鸡肿瘤病,而 RE 和 AL 也有一定的流行,特别是 RE 的阳性率也比较高,令人吃惊和深思。

从表3可知,总的混合感染率为 16.25%,混合感染以 MD+ RE 最常见,占检测总数的 10.4%。

由表4可知,3种肿瘤病在 60 日龄以上鸡群中的发病率较高,但是在低日龄鸡群中也有较高的发病

率,即比传统的发病日龄较为提前

表 1 广西和安徽样品 3 种鸡肿瘤病的阳性检出率

Table 1 Positive rates of avian tumors in birds tested in Guangxi and Anhui

MD(%)		RE(%)		AL(%)	
群 Flock	羽 Bird	群 Flock	羽 Bird	群 Flock	羽 Bird
72.87	57.17	23.48	11.84	12.96	5.47
(180/247)	(565/988)	(58/247)	(117/988)	(32/247)	(54/988)

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

表 2 广西样品 3 种肿瘤病占总发病的百分比

Table 2 Incidence rates of avian tumors in the positive birds in Guangxi sample

MD(%)		RE(%)		AL(%)	
群 Flock	羽 Bird	群 Flock	羽 Bird	群 Flock	羽 Bird
93.13	98.42	28.75	17.72	17.50	10.07
(149/160)	(445/457)	(46/160)	(81/457)	(28/160)	(46/457)

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

表 3 广西样品肿瘤病病毒单一、混合感染的检测结果

Table 3 The single and multiple infections of avian tumors

肿瘤病 Avian tumors		阳性率 Positive rates(%)	
		群 Flock	个体 Bird
单一感染 Single infection	MD	40.30(81/201)	48.90(334/683)
	RE	0(0/201)	1.17(8/683)
	AL	1.49(3/201)	0.88(6/683)
二重感染 Dual infection	MD+ RE	19.90(40/201)	10.40(71/683)
	MD+ AL	9.45(19/201)	7.04(34/683)
三重感染 Triple infection	MD+ RE+ AL	2.99(6/201)	0.87(6/683)

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

表 4 广西病例不同年龄段的检出率

Table 4 Incidence rates of avian tumors in birds of different ages in Guangxi sample

年龄 Age	MD(%)		RE(%)		AL(%)	
	群 Flock	个体 Bird	群 Flock	个体 Bird	群 Flock	个体 Bird
≥ 60d	92.91	79.48	26.43	14.17	15.71	6.16
	(131/141)	(395/497)	(37/140)	(69/487)	(22/140)	(30/487)
< 60d	32.47	14.75	17.42	6.12	9.84	8.16
	(25/77)	(62/356)	(9/61)	(12/196)	(6/61)	(16/196)

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

由表 5 可知,对于 MD、RE 而言,腺胃均为检出率最高的器官,肝脏则是 AL 检出率最高的器官。

#### 2.4.2 对免疫抑制性疾病的检测应用

从表 6、表 7 看出,3 种鸡肿瘤病均有与其它免疫抑制病 (IBDV、CIAV、ReoV) 混合感染的现象,其中 MD、RE 分别与 CIAV 的二重感染率最高,分别达 15.14%、1.41%,甚至有四重感染 MDV+ CIAV+ REV+ ALV 的情况,占 1.06%;特别值得注意的是在 MD 阳性病例中免疫抑制性病毒混合感染率高达 78.62%,表明它们之间具有明显的相互促进、协同的

作用。

表 5 广西样品不同器官各肿瘤病的检出率

Table 5 Detection rates of different visceral organs in the birds tested in Guangxi sample

器官 Organs	MD(%)	RE(%)	AL(%)
肝 Liver	40.84(136/333)	11.34(11/97)	18.81(19/101)
脾 Spleen	60.82(118/194)	11.34(11/97)	15.15(15/99)
肾 Kidney	60.26(91/151)	9.78(9/92)	8.05(7/87)
腺胃 Proventriculus	68.97(120/174)	21.88(21/96)	7.78(7/90)

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

表 6 疑似免疫抑制性疾病病例中肿瘤病原及其它病原感染的检测结果

Table 6 Infections of tumor virus and other pathogens in immunosuppressive cases

肿瘤病 Avian tumors	群阳性率 Positive rates of flock (%)	个体阳性率 Positive rates of bird (%)
MDV	32.41(35/108)	16.61(107/644)
ALV	8.33(9/108)	2.8(18/644)
REV	12.96(14/108)	4.19(27/644)
CIAV	7.22(78/108)	28.88(186/644)
IBDV(≤ 60d)	24.58(18/73)	52(52/100)
MDV+ CIAV	15.14(43/284)	
REV+ CIAV	1.41(4/284)	
MDV+ IBDV	0.95(2/211)	
CIAV+ IBDV	10.9(23/211)	
CIAV+ MDV+ REV	4.93(14/284)	
MDV+ ALV+ CIAV	1.76(5/284)	
MDV+ CIAV+ IBDV	3.32(7/211)	
MDV+ ALV+ IBDV	0.47(1/211)	
MDV+ CIAV+ REV+ ALV	1.06(3/284)	

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

表 7 MD 阳性病例中免疫抑制性病毒混合感染的检测结果

Table 7 Detections of immunosuppressive viruses in the MD positive birds

混合感染 Co-infections	阳性率 Positive rates (%)	总阳性率 Total positive (%)	混合 感染率 Total multiple infection (%)
二重感染 Dual infection			
MD+ AL	38.46 (30/78)	55.97 (98/159)	78.62 (125/159)
MD+ RE	3.85 (3/78)		
MD+ CIA	35.22 (56/159)		
三重感染 Triple infection			
MD+ AL+ CLA	5.13 (4/78)	19.5 (31/159)	
MD+ RE+ CIA	11.95 (19/159)		
MD+ IBD+ CIA	7.69 (6/78)		
MD+ REO+ CIA	2.56 (2/78)		
四重感染 Quadruple infection			
MD+ RE+ AL+ CIA	3.14 (5/159)	3.14 (6/159)	

括号内是阳性数/检测数。Data in brackets are positive number/total number tested.

#### 2.5 PCR 和核酸探针技术比较的结果

表 8、表 9 的结果表明,两种检测技术都有很高

的特异性,相比而言 PCR技术检测的敏感性更高,而且更快速,操作更简便,成本更低,商业化应用的前景更广阔。

表 8 PCR和核酸探针点杂交对比检测鸡肿瘤病的结果  
Table 8 Results of detections for tumors by PCR and DNA Dot-hybridization

疾病种类 Diseases	PCR检出率 PCR detection(%)	探针检出率 Dot-hybridization detection(%)
MD	81.9(86/105)	77.1(54/70)
RE	53.3(56/105)	27.1(19/70)

括号内是阳性数/总检测数。Data in brackets are positive number/total number tested

表 9 PCR技术与核酸探针技术应用于鸡肿瘤病诊断比较  
Table 9 The comparison of PCR and DNA dot-hybridization for tumors diagnosis

比较项目 Compare items	PCR技术 PCR detection	核酸探针技术 Dot-hybridization
诊断时间 Duration	5h	> 20h
诊断过程 Procedure	自动化程度高 Automatic	手工操作,繁杂 Manual
所需仪器 Instruments needed	多 More	少 Less
敏感性 Sensitivity	很高 Very high	较高 High
临床应用 Application	适于大量样品检测 Mass samples	适于大量样品检测 Mass samples
耗材成本 (以 40个样品总计,元) Cost of detections (40 samples, Yuan)	81.36	143

### 3 讨论

本研究运用分子生物学技术,通过对核酸抽提、引物设计、PCR反应等程序的优化,先后建立了 MD、RE和 AL的特异性强、快速、敏感的 PCR诊断方法,首次成功地摸索出诊断鸡肿瘤病的三重 PCR方法并研制出相应的试剂盒,为肿瘤病的研究和临床诊断提供了非常方便的手段。该试剂盒中三重 PCR方法的应用,不仅节约了时间和成本,而且快速、敏感,反应体系稳定。该方法对当前普遍存在的 MD、RE和 AL混合感染的鉴别诊断是一个非常有用的工具。试剂盒的研制成功,大大方便临床应用,为基层掌握和运用该项技术提供了便利(现已分别在广西玉林市畜牧兽医站和安徽农业大学推广应用)。在与核酸探针技术的比较发现,PCR技术在诊断时间、诊断方法的简便性、诊断成本等方面均表现出明显的优越性。而且,对于 MD的诊断,PCR技术还能够准确区分 MDV-1的强毒株与疫苗株。这是血清学等常规诊断方法所不能够达到的,因此,该方法在目前广泛进行马立克氏病疫苗免疫的鸡群仍具有重要的诊断价值。

在试剂盒的应用中,对广西、安徽两省的鸡肿瘤或可疑肿瘤组织的检测结果发现,MD、RE和 AL的总阳性率分别为 57.17%、11.84%和 5.47%;其中,在广西病料中,各病的单一阳性率分别为 48.90%、1.17%和 0.88%,二重和三重的阳性率分别为 17.44%和 0.87%。不同日龄鸡的比较表明,60日龄以上鸡 MD和 RE的阳性率大大高于 60日龄以下鸡。不同内脏器官的比较表明,腺胃分别是 MD、RE检出率最高的器官(分别为 68.97%和 21.88%),而肝脏则是 AL检出率最高的器官(为 18.81%)。因此,在应用本试剂盒进行临床肿瘤病的诊断时,可优先选择采集检出率最高的器官。在将试剂盒扩大到免疫抑制病的检测时发现,3种鸡肿瘤病与其他免疫抑制病的混合感染严重,混合感染率达 35.92%,在 MD的阳性病例中,免疫抑制性疾病混合感染率高达 78.62%,表明它们之间具有明显的相互促进或协同的作用。由于病料的来源具有广泛性和代表性,这些结果均反映了鸡肿瘤病和免疫抑制病在广西和我国其它一些省区的存在和流行。4年多时间在四个省区对 1805羽病、死鸡和火鸡总计 4670份临床样品的广泛应用证明,建立的鸡肿瘤病快速鉴别诊断程序及试剂盒具有操作简便快捷、结果准确可靠、保存方便等特点,不仅适用于临床肿瘤病的鉴别诊断,而且对肿瘤病的流行病学的调查、免疫抑制病的检测以及兽医检疫也有重要价值,为这些疾病的防治提供可靠的诊断工具。

目前,广西已被证实有 vvMDV 毒株的存在<sup>[16]</sup>,它能突破一般疫苗(如 HVT疫苗)的免疫。结果除了引起 MD的肿瘤发生外,还可引起不同程度的免疫抑制,表现为胸腺、法氏囊萎缩和其它多种病原的继发感染<sup>[1]</sup>。本研究对典型病例流行病学的分析表明,阳性病例大多存在不同程度的细菌性(如大肠杆菌、葡萄球菌)、病毒性(如 AI、ND、IB)和球虫等之混合感染,疫苗免疫效果不佳,如 ND疫苗免疫后抗体多达不到应有的水平且发病后难以控制等情况。我们证实这种情况与肿瘤病的高发病率之间有直接的联系。MDV的早期感染以及感染后在机体的持续存在及其所导致的免疫抑制一直为人们所忽视。长期以来,不少人认为 MD只发生于 9周龄以上的成年鸡,而对生长周期短的商品肉用鸡几乎不进行免疫,即使免疫也只是采用 HVT免疫,用 CV1988疫苗免疫的更是少数。大量未进行免疫的商品肉鸡群成为广泛的易感鸡群,而易感鸡群又促进 MDV的大量增殖和广泛传播。加上养禽业中不同日龄、不同品系的混养比较常见,造成 MDV强毒在免疫和没有免疫的鸡群中依然可互相传播,促成恶性循环<sup>[12]</sup>。

本项目成果应用和发布后对养禽业影响最大的就是改变或者完善企业原来的 MD 防控措施,即由原来的不免疫或免疫 HVT 疫苗,只注重免疫、不注重生物安全等等,逐渐完善到现在的既免疫 CV 1988 / Respons 疫苗,又注重生物安全的正确防控措施。养禽业特别是大型龙头企业中 MD 的危害已得到有效的控制,肿瘤病的危害已从上世纪 90 年代中后期的平均 7%~10% 的临床发病率降低至现在的平均 2% 左右。这是一个具有重大意义的进展,不管是在养禽业的经济效益的层面上,还是在家禽的健康以及其它疾病的有效控制上。

参考文献:

[1] Witter R L. Current and future. Strategies for control of Marek's Disease [M]. In: Fadly A M, et al. (eds.) Avian Tumor Virus Symposium, Omnipress, WI, USA, 1997. 42-47.

[2] 崔治中. 鸡群中免疫抑制性病毒蛋传病毒的多重感染 [J]. 中国家禽, 2000, 22(5): 17-18.

[3] 王桂军, 韦平, 何秀苗, 等. 鸡三种肿瘤病在广西的流行病学研究 [J]. 中国家禽, 2002, 24(10): 13-15.

[4] 何秀苗, 韦平, 李康然, 等. 鸡多种肿瘤病快速鉴别诊断的研究初报 [J]. 广西农业生物科学, 2001, 20(1): 85-86.

[5] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南 [M]. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 1999.

[6] 何秀苗, 王桂军, 韦平. 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 [J]. 广西科学, 2000, 7(4): 319-323.

[7] 王桂军. PCR 技术鉴别诊断鸡肿瘤病的应用研究 [C] [硕士论文]. 南宁: 广西大学, 2002.

[8] 韦平, 何秀苗, 王桂军, 等. 鸡肿瘤病快速鉴别诊断技术的建立 [J]. 扬州大学学报, 2002, 23(2): 1-5.

[9] 韦平, 李康然, 何秀苗, 等. 鸡三种肿瘤病快速鉴别诊断的研究初报 [J]. 广西畜牧兽医, 2000, 17(2): 3-5.

[10] 韦平, 王桂军, 何秀苗, 等. 鸡肿瘤病快速鉴别诊断试剂盒的研制及应用 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(12): 3-6.

[11] 蒋玲艳, 李莉萍, 韦平, 等. 广西鸡传染性贫血流行病学研究 [J]. 广西畜牧兽医, 2003, 20(2): 52-54.

[12] 龙进学, 韦平, 阳秀英. 传染性法氏囊病快速诊断技术的建立及其应用 [J]. 广西大学学报 (自然科学版), 2003, 28(2): 103-108.

[13] 李斌. 禽呼肠孤病毒感染流行病学调查与广西地方分离株 S1 基因的测序和克隆 [C] [硕士论文]. 南宁: 广西大学, 2004.

[14] 王桂军, 韦平, 李康然, 等. PCR 和核酸探针技术诊断鸡肿瘤病的比较研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(6): 490-493.

[15] 韦平. 马立克氏病研究的最新进展 [J]. 广西农业生物科学, 2000, 19(2): 110-115.

[16] 黄安国, 蒋玉雯, 白安斌, 等. 鸡马立克氏病病毒分离株毒力比较试验 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(2): 10-11.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 61 页 Continue from page 61)

[6] Dvorak H F, Brown L F, Detmar M, et al. Vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis [J]. Am J Pathol, 1995, 146: 1029-1039.

[7] Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, et al. A unique signal transduction from FLT tyrosine, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF [J]. Oncogene, 1995, 10: 135-147.

[8] Warren R S, Yuan H, Matli M R, et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis [J]. J Clin Invest, 1995, 95: 1789-1797.

[9] Huang G W, Sunagawa M, Li J E, et al. The relationship between microvessel density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the extension of nasopharyngeal carcinoma [J]. Laryngoscope, 2000, 110: 2066-2069.

[10] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. Cell, 1996, 86: 353-364.

[11] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88: 277-285.

[12] Lund E L, Spang-Thomsen M, Skovgaard-Poulsen H, Kristjansen P. Tumor angiogenesis—a new therapeutic target in gliomas [J]. Acta Neurol Scand, 1998, 97: 52-62.

[13] Potgens A J, Lubsen N H, van Altena M C, et al. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice [J]. Am J Pathol, 1995, 146: 197-209.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)