

前 言

马立克氏病(Marek's disease 简称 MD)是鸡的一种由马立克氏病疱疹病毒(简称 MDV)引起的传染性肿瘤性疾病。其病理组织学特征为外周神经、性腺、虹膜、各种内脏器官、肌肉和皮肤的单个或多个组织器官发生肿瘤性淋巴细胞浸润。病鸡表现为消瘦、肢体麻痹,并常有急性死亡。MD 传染性强,死亡率高,是鸡的主要传染病之一。

我国 70 年代末研究和建立了 MD 琼脂扩散特异性血清学诊断方法,先后研制和改进了用于 MD 血清学诊断用的 MD 皮肤抗原和 MDV 细胞培养抗原。这两种抗原用于 MD 的检测与国外同类进口抗原相比,具有同样的敏感性。

然而由于 MD 疫苗的使用,仅能预防 MD 肿瘤的发生,不能阻止环境中 MD 野外毒株的感染及在体内的复制;同时 MD 血清 I 型疫苗的应用,也可以刺激机体产生相应的抗体,并可以检测到病毒抗原的存在。因此,尽管 MD 琼脂扩散试验具有良好的特异性,MD 琼脂扩散试验的检测结果,对于 MD 的临床诊断仅具有参考价值。

MDV 广泛存在于自然界中。除 SPF 鸡群外,几乎所有的鸡场都不同程度的存在着 MDV 野外毒株的流行。MDV 野外毒株致病力强弱存在着差异,因此病鸡临床主要表现为神经型(古典型)和内脏型(急性型);此外,比较少见的还有皮肤型和眼型,有时可以混合发生。大多数死于 MD 的鸡剖检时,在各内脏器官中可以见到单发性或多发性肿瘤,最常见的肿瘤发生部位有肝脏、肾脏、性腺等内脏器官。值得注意的是,其他一些禽病也可以导致内脏肿瘤的发生,如禽白血病(LL)和网状内皮增生病(RE)。其肿瘤的外观形态与 MDV 引起的肿瘤在临床剖检时无法区别,应通过病理组织学变化进行判定。

另外,MD 的临床诊断还可以通过 MD 特征性的临床症状和病理变化作为诊断依据。如病鸡临床症状表现为两腿前后伸展,呈“劈叉”姿势;尸体剖检时可见到坐骨神经单侧或双侧肿大、横纹消失、皮肤发生肿瘤、虹膜褪色和瞳孔不规则。这些变化在其他传染病很难见到,可以作为 MD 的临床诊断指征。

总之,由于 MD 发病机理及致病过程比较复杂,其血清学诊断方法应用范围有一定的局限性,对于临床诊断仅具有参考价值。而 MD 的特征性的临床症状及剖检病理变化在发病鸡群中并不常见,MD 的临床诊断一般需要病理组织学检查进行确诊。

本标准的附录 A、附录 B 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提示。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:赵晓岩、吴东来。

鸡马立克氏病诊断技术

Diagnostic techniques for Marek's disease

1 范围

本标准规定了鸡马立克氏病(MD)的诊断技术。

本标准适用于 MD 的流行病学普查、产地和口岸检疫、SPF 鸡群的疫病监测。

2 MD 琼脂扩散试验检测技术

鸡马立克氏病琼脂扩散试验既可以用于马立克氏病病毒抗原的检出,也可以用于马立克氏病病毒抗体的检出。该方法一般在马立克氏病病毒感染 14 d~24 d 后检出病毒抗原;抗体的检出一般在病毒感染 3 周后。

2.1 材料准备

2.1.1 抗原和标准阳性血清。

2.1.2 溶液配制:

- a) pH7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液;
- b) 1%硫柳汞溶液;
- c) 生理盐水。

以上各种溶液配制方法见附录 A(标准的附录)。

2.1.3 琼脂板的制备:见附录 B(标准的附录)。

2.2 操作方法

2.2.1 马立克氏病病毒抗原检测

2.2.1.1 打孔

2.2.1.1.1 在已制备的琼脂板(见附录 B)上,用直径 4 mm 或 3 mm 直径的打孔器按六角形图案打孔,或用梅花形打孔器打孔。中心孔与外周孔距离为 3 mm。

2.2.1.1.2 将孔中的琼脂用 8 号针头斜面向上从右侧边缘插入,轻轻向左侧方向挑出,勿损坏孔的边缘,避免琼脂层脱离平皿底部。

2.2.1.2 封底

用酒精灯火焰轻烤平皿底部至琼脂轻微溶化为止,封闭孔的底部,以防样品溶液侧漏。

2.2.1.3 加样

用微量移液器吸取用灭菌生理盐水稀释的标准阳性血清(按产品使用说明书的要求稀释)滴入中央孔,标准阳性抗原悬液分别加入外周的第 1、第 4 孔中,在外周的第 2、3、5、6 孔处(不打孔)按顺序分别插入被检鸡的羽毛髓质端(长度约 0.5 cm);或在第 2、3、5、6 孔中加入被检的羽髓浸出液,每孔均以加满不溢出为度,每加一个样品应换一个吸头。

2.2.1.4 感作

加样完毕后,静止 5 min~10 min,将平皿轻轻倒置,放入湿盒内,置 37℃温箱中反应,分别在 24 h

和 48 h 观察结果。

2.2.2 马立克氏病抗体检测

操作方法同 2.2.1, 加样如下: 用微量移液器吸取用灭菌生理盐水(见附录 A 中 A3)稀释的标准抗原液(按产品使用说明书的要求稀释)滴入中央孔, 标准阳性血清分别加入外周的第 1、第 4 孔中, 待检血清按顺序分别加入外周的第 2、3、5、6 孔中。每孔均以加满不溢出为度, 每加一个样品应换一个吸头。

2.3 结果判定及判定标准

MD 琼脂扩散试验结果判定如图 1 所示

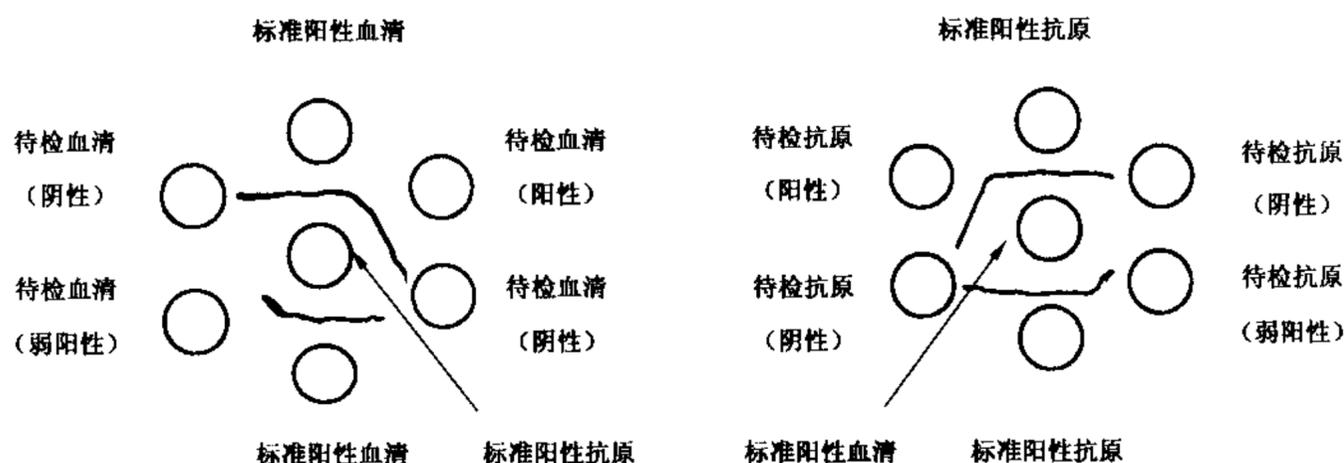


图 1 MD 琼脂扩散试验结果判定示意图

2.3.1 将琼脂板置日光灯或侧强光下进行观察, 当标准阳性血清与标准抗原孔间有明显沉淀线, 而待检血清与标准抗原孔间或待检抗原与标准阳性血清孔之间有明显沉淀线, 且此沉淀线与标准抗原和标准血清孔间的沉淀线末端相融合, 则待检样品为阳性。

2.3.2 当标准阳性血清与标准抗原孔的沉淀线的末端在毗邻的待检血清孔或待检抗原孔处的末端向中央孔方向弯曲时, 待检样品为弱阳性。

2.3.3 当标准阳性血清与标准抗原孔间有明显沉淀线, 而待检血清与标准抗原孔或待检抗原与标准阳性血清孔之间无沉淀线, 或标准阳性血清与抗原孔间的沉淀线末端向毗邻的待检血清孔或待检抗原孔直伸或向外侧偏弯曲时, 该待检血清为阴性。

2.3.4 介于阴、阳性之间为可疑。可疑应重检, 仍为可疑判为阳性。

3 MD 的临床诊断与判定标准

3.1 MD 的特征性临床症状

在鸡群中, 病鸡临床症状表现为瘫痪, 并且两腿前后伸展呈“劈叉”姿势时, 一般可以作为 MD 的示病症状, 可初步判定为 MD。

3.2 MD 的特征性病理变化

3.2.1 MD 的神经特征性病理变化

神经型 MD 的病理变化为外周神经肿胀, 呈半透明水肿样, 色泽变淡, 横纹消失, 其肿胀程度一般为正常神经的 2~3 倍。这些变化多发生在腰荐神经丛、坐骨神经丛、臂神经丛、颈部迷走神经丛等部位。由于多为不对称性, 通过比较对侧神经将有助于判定。

3.2.2 MD 的皮肤特征性病理变化

皮肤型 MD 病理变化比较少见。其病理变化特征为: 以皮肤的羽毛囊为中心, 形成半球形隆起的肿瘤, 其表面有时可见鳞片状棕色痂皮。

3.2.3 MD 的眼睛特征性病理变化

眼型 MD 是由于淋巴细胞浸润虹膜而导致的病理变化, 虹膜呈环状或斑点状褪色, 出现淡灰色; 瞳孔不规则, 有时偏向虹膜一侧。

3.3 MD 的病理组织学变化

采集病鸡肿胀的外周神经和内脏的肿瘤组织样品,按常规方法制备石蜡切片、苏木素伊红(HE)染色。通过普通光学显微镜进行病理组织学观察判定。

根据病变组织中浸润细胞的种类及形态学,外周神经病理组织学变化可分为 A、B、C 三个型。在同一只鸡的不同神经可能会出现不同的病变型。A 型病变以淋巴母细胞,大、中、小淋巴细胞及巨噬细胞的增生浸润为主。B 型病变表现神经水肿,神经纤维被水肿液分离,水肿液中以小淋巴细胞、浆细胞和许旺氏细胞增生为主。C 型病变为轻微的水肿和轻度小淋巴细胞增生。

内脏和其他组织的肿瘤与 A 型神经病变相似。通常为大小各异的淋巴细胞增生为主。

3.4 鉴别诊断

禽白血病(LL)和网状内皮增生病(RE)是两种主要的在病理剖检中容易与缺乏外周神经病变的内脏型 MD 相混淆的传染病。一般需要通过流行病学和病理组织学进行鉴别诊断。

3.4.1 与 LL 鉴别诊断

在流行病学方面,LL 一般发生于 16 周龄以上的鸡,并多发生于 24~40 周龄之间。而 MD 的死亡高峰一般发生在 10~20 周龄之间。另外,LL 的发病率较低,一般不超过 5%,而 MD 的发病率较高。

LL 肿瘤病理组织学变化主要表现为大小均一的淋巴母细胞增生浸润。另外,在 LL 与 MD 引起的法氏囊肿瘤中,其肿瘤细胞的浸润部位存在着差异。MD 肿瘤细胞主要在滤泡间增殖,而 LL 肿瘤细胞则主要在滤泡内增殖。

3.4.2 与 RE 鉴别诊断

尽管 RE 在不同的鸡群中感染率差异较大,但一般发病率较低。本病的病理组织学特点为:未分化的大型肿瘤细胞增殖,肿瘤细胞具有丰富的嗜碱性细胞质、核大而淡染,核内有较大的嗜碱性核仁,肿瘤细胞多见有丝分裂像。

附录 A
(标准的附录)
溶液的配制

A1 pH7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液的配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.3 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g

将上述试剂依次加入容器中,用无离子水或蒸馏水溶至 1 000 mL。

A2 1%硫柳汞溶液的配制

硫柳汞	1 g
蒸馏水	100 mL

溶解后,置 100 mL 瓶中盖塞存放备用。

A3 生理盐水的配制

氯化钠(NaCl)	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

溶解后,置玻璃瓶中灭菌后存放备用。

附录 B
(标准的附录)
琼脂平板的制备

在 250 mL 容量的三角瓶中分别加入 pH7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液溶液(见附录 A 中 A1) 100 mL、琼脂糖 1.0 g、氯化钠 8 g。将三角瓶在水浴中煮沸使琼脂糖充分融化,再加入 1%硫柳汞(见附录 A 中 A2)1 mL,混合均匀,冷却至 45℃~50℃,将洁净干热灭菌的直径为 90 mm 的平皿置于平台上,每个平皿加入 18 mL~20 mL。加盖待凝固后,把平皿倒置以防水分蒸发,放普通冰箱 4℃中冷藏保存备用(时间不超过 2 周)。