

الفيروسات السرطانية: ليكوسيس/ساركوما (تكثر نسيج البيض)

وريتيكلوإندوثيليوسيس (شباك بطاني)

ONCORN VIRUSES: LEUKOSIS/SARCOMAS AND RETICULOENDOTHELIOSIS

Aly M. Fadly and Richard L. Witter

Summary

فيروس ليكوسيس الطيور (ALV) وفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس (REV) هي أكبر فيروسات سرطانات الطيور الشائعة الموجودة طبيعياً والمرتبطة مع ظروف المرض السرطاني في الدواجن. يصيب فيروس ليكوسيس أساساً الدجاج، بينما يصيب فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس الدجاج والرومي والبط والفران والسمان والعديد من أنواع الطيور الأخرى. بالإضافة إلى الأورام التي تحدث، فإن كلاً من الفيروسين يستطيع أن يقلل الإنتاجية ويحدث تثبيطاً مناعياً ومشاكل إنتاج أخرى في القطعان المصابة. اختبارات الفيروس أو الجسم المضاد غير عملية للمساعدة في التشخيص التفريقي للأمراض السرطانية نتيجة الفيروس في الدواجن لأن فيروسات الطيور السرطانية واسعة الانتشار والإصابة في غياب تكوين الورم تكون شائعة. استخدمت التقنية الحالية المبنية على التهجين الجزيئي أو الكيمياء الخلوية المناعية مع الأجسام المضادة أحادية الصفة للأنتيجينات الخلوية والسرطانية النوعية لتطوير طرق أكثر حساسية ونوعية للتشخيص المقارن للأورام المسببة بفيروسات الطيور. لا تتوافر اللقاحات التي تقي الدجاج والرومي من الإصابة بفيروس ليكوسيس وريتيكلوإندوثيليوسيس تجارياً.

Agent Identification

يفضل عمل التشخيص بعزل الفيروس في مزرعة الخلية، وإظهار أنتيجين المجموعة النوعي في زلال البيض بالإليزا، والتأكد أنها فيروسات سرطانية بالاختبارات مثل تعادل الفيروس والتألق المناعي. تكون هذه الاختبارات للفيروس أو الأنتيجين مفيدة جداً في تعريف وتقسيم المعزولات الجديدة، وترصد القطعان الخالية من المرض

وقطعان الأمهات الأخرى لخلوها من الإصابة بالفيروس ، واستدراك الإصابة بفيروس ، واستبعاد الأخرى وفي اختبارات الأمان للقاحات.

Serologic Detection in the Host

اختبار تعادل الفيروس هو الأكثر حساسية لتحديد الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتيكولواندوثيلوسيس ويمكن أيضاً استخدام اختبار أطقم الإليزا التجارية لتوضيح الجسم المضاد للنوعين. يمكن أن يستخدم اختبار الترسيب في الآجار لكشف الجسم المضاد لفيروس ريتيكولواندوثيلوسيس لكنه ليس على درجة حساسية الإليزا والتألق المناعي.

Introduction

أطلق سابقاً على الليكوسيس الليمفاوي (LL) مرض الكبد الكبير أو السرطان الليمفاوي الحشوي ويسببه فيروس ليكوسيس الطيور وهو مرض شائع الحدوث في الدجاج ويتسبب بواسطة فيروسات الطيور السرطانية المجموعة ليكوسيس/ساركوما. حديثاً وجد نمط جديد (J) يرتبط مع الحدوث العالي نسبياً للسرطان الخلوي للخلايا النخاعية (myelocytomatosis) في الدجاج اللاحم (26). ينتقل سرطان الطيور الليمفاوي تناسلياً أو بالتلامس المباشر ويحدث في جميع أنحاء العالم في كل قطعان الدجاج على الأغلب. يمكن لعوامل الإجهاد أو التثبيط المناعي أن تزيد قابلية الدجاج للإصابة بالفيروس وإفرازه. يضم ريتيكولواندوثيلوسيس مجموعة من المتلازمات المرضية التي يسببها فيروس ريتيكولواندوثيلوسيس من فيروسات الطيور المسببة للسرطان. أكثر الأمراض الإكلينيكية شيوعاً هو الورم الليمفاوي المزمن والتقرم، إلا أن سرطان الخلية الشبكية الحاد يمكن أن يحدث بواسطة العترة العملية (عترة T) التي هي خليط من الفيروس السرطاني المحتوي على الفيروس المتفقر للتناسخ والفيروس المساعد غير الناقص و nondefective helper virus و oncogene-containing replication-defective virus (43). ينتقل الفيروس رأسياً وأفقياً، وبحقن المواد البيولوجية الملوثة، يتوافر بحوث مرجعية شاملة على مجموعات ليكوسيس ساركوما وريتيكولواندوثيلوسيس الطيور (27, 46).

Clinical Disease

بالإضافة إلى الليكوسيس الليمفاوي وساركوما تحدث فيروسات ليكوسيس ساركوما مدى واسعاً من الحالات السرطانية مثل السرطان العظمي، وسرطان خلايا الدم الحمراء، وسرطان الأعضاء الدموية، وسرطانات الكلى، وسرطان الخلايا النخاعية بنوعها. يتأثر نوع الورم بعترة الفيروس وجرعة التعرض والنوع الجيني للعائل

وطريقة العدوى والجنس والعمر عند التعرض (27). ينشأ السرطان الليمفاوي (LL) أو السرطان الليمفاوي لخلايا B في الدجاج في بصيلات بيرسا فايريبي مع خلايا ليمفاوية بيرسا متحورة منتشرة إلى الكبد والطحال والأعضاء الحشوية الأخرى (15). لأن فترة الحضانة طويلة نسبياً (نادراً أقل من ١٤ أسبوعاً)، يحدث مرض الليكوسيس الليمفاوي في الأمهات وقطعان إنتاج البيض، لكن ليس في الدجاج اللاحم. الأعراض المرضية لليكوسيس الليمفاوي غير نوعية (27). يمكن اكتشاف تضخم البورصة والكبد بالجس في الحالات المتقدمة. تشريحياً، وجود عقد ليمفاوية متضخمة في البيرسا يعتبر مميزاً لليكوسيس الليمفاوي، وقد تكون الآفات في الكبد والأعضاء الحشوية الأخرى شائعة أو عقدية. مجهرياً، يتميز الليكوسيس الليمفاوي بالتخلل داخل بصيلات البيرسا مع الخلايا السرطانية (27). وجد أن لقاح مرض مارك المحتوي على النوع المصلي ٢ لفيروس هيريس مرض مارك (5) يحفز تطور الليكوسيس الليمفاوي في خطوط معينة من الدجاج عقب التعرض لفيروس ليكوسيس الطيور بعد الفقس (3، 18). نادراً ما تظهر العدوى الطبيعية بفيروس ريتكلواندوثيلوسيس إكلينيكيًا في الدواجن. يحدث نفوق في الرومي عند عمر ١٢ إلى ٢٠ أسبوعاً. الأورام الليمفاوية تظهر في الكبد والأمعاء والقلب وبقية الأحشاء الأخرى، ويحدث تضخم في الأعصاب (46). الخلايا السرطانية تكون كبيرة ومتماثلة ولكن لا يظهر ذلك في النسل. في الدواجن التي تم إعدادها بالفيروس عند الفقس، يمكن لمرض التقدم أن يحدث خلال ٢ - ٣ أسابيع. هذا المرض يتميز بتأخر في النمو وتشوه في ظهور الريش (19).

تجريبياً وجد أن إعداء الدواجن بفيروس ريتكلواندوثيلوسيس يسبب نوعين من الأورام الليمفاوية: ورم ليمفاوي بيرسا لخلايا بي B-cell، وورم ليمفاوي لا بيرسا لخلايا تي T-cell (46). وتختلف الاستجابة على حسب سلالة الفيروس والجرعة وطريقة التعرض ونوع الطائر. بسبب أن الأضرار عادة لا تكون مميزة لمرض معين، فإن تشخيص المرض إكلينيكيًا يجب أن يعتمد على كل من الخصائص المرضية وتأكد العدوى مصلياً وفيروسياً. لقاحات المصل ٢ MD وجد أيضاً أنها تزيد من تطور فيروس ريتكلواندوثيلوسيس المسبب للورم الليمفاوي لخلايا B ولكن لا يسبب ذلك لخلايا T.

Sample Collection

Avian Leukosis

لأنه واسع الانتشار بين الدجاج، فإن عزل الفيروس وإظهار الأنتيجين أو الجسم المضاد له قيمة محدودة أو ليس له قيمة في تشخيص الحالات الحقلية لليكوسيس الليمفاوي، إلا أن الاختبار للفيروس أو الأنتيجين أو الجسم المضاد يكون مساعد البرامج لخفض أو التخلص من الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور. يجب أن تجمع المواد والخامات والفيروس والأنتيجين والمصل المضاد وتوضع على ثلج ذائب أو تحفظ عند -٧٠ م حتى تُختبر. عادة

تجمع العينات في المحلول المنظم المستخدم في الاختبار المقرر وتخزن في -٢٠ م. تجمع العينات للاختبار بالإليزا في محلول ملح فوسفات يحتوي على ٠.١٪ توين ٨٠، بينما العينات المراد فحصها باختبار تثبيت المتمم تجمع في محلول باريبتال أو فيرونال.

Whole Blood, Plasma, or Serum

الدم الكامل والبلازما هي الأكثر استخداماً لعزل الفيروس. يجمع الدم بمحقن يحتوي على ٥٠ وحدة من الهيبارين الخالي من المواد الحافظة/مل. قد يتداخل الهيبارين مع تكاثر فيروسات ليكوسيس الطيور من غير النمط تحت المجموعة A. قد تستخدم مضادات التجلط الأخرى [مثل ١٠٪ (حجم/حجم) من ٣.٥٪ محلول سترات الصوديوم]، أو الدم لجمع المصل يمكن أن يجمع في أنابيب تحتوي ٠.١ - ٠.٢ مل من ٢٥٪ مستخلص أجنة دجاج مشط حرارياً (من أجنة معروف خلوها من فيروس ليكوسيس الطيور) لتحفيز التجلط. يجب أن يوضع الدم على ثلج ذائب بسرعة بعد التجلط. يرسل الدم الكامل سريعاً بعد جمعه على عبوات ثلجية ولا يجب أن يجمد. عينات البلازما أو المصل للعزل الفيروسي يجب أن ترسل على ثلج جاف. لتجنب التداخل بالأجسام المضادة المعادلة، يفضل عزل فيروس ليكوسيس الطيور من عينات حديثة من خلايا الدم البيضاء أو الدم الكامل. إذا كان هناك ضرورة للتأخير، يجب أن يضاف وسط مزرعة نسيج يحتوي على ١٠٪ داي ميثيل سلفوكسيد و ١٥٪ مصل أبقار إلى العينة وعندئذ يجب أن تجمد العينة ببطء وتحفظ عند -١٩٦ م. عينات البلازما والمصل غير مناسبة لاكتشاف فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (exogenous ALV) بالاختبار للأنتيجين كأنتيجين داخلي محدد للمجموعة (endogenous) لأنه قد يؤدي إلى نتائج إيجابية وهمية (28).

Meconium and Cloacal or Vaginal Swabs

المخاط من صوص دجاج عمر يوم أو المسحات من المجمع أو المهبل من الدجاج الكبير يمكن أن تستخدم لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة (27). تؤخذ عينات المجمع بدوران مسحات القطن المعقمة خمس مرات في المجمع. يجب عدم السماح للمادة البرازية الزائدة لتلتصق بالمسحات. تؤخذ المسحات المهبلية عن طريق قلب المجمع كما في التلقيح الصناعي ولا تستخدم لاختبار الدجاجات التي ليست في مرحلة إنتاج البيض لأن المجمع في مثل هذا الدجاج لا ينقلب بسهولة. لعزل الفيروس توضع المسحات في أنبوبة تحتوي على وسط مزرعة نسيج مزود بـ ١٠٠٠ وحدة من البنسلين G، وسلفات سترتتومييسين، و ١٠٠ ميكروجرام من جنتاميسين، و ٥ ميكروجرامات امفوترسين B لكل مليلتر. يجمع المخاط للعزل بوضع أنبوبة تحتوي السائل السابق وصفه (١ مل)

عند فتحة المجمع ويضغط على البطن بحفة. قبل الاختبار تزال المواد الصلبة من عينات المخاط بالطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق.

Albumen

يمكن أن يستخدم لكشف الفيروس أو الأنتيجين المحدد للمجموعة (40) وهو الأكثر حساسية ووسيلة عملية للتعرف على الدجاجات التي تنقل فيروس ليكوسيس الطيور خلقياً. يمكن سحب العينات من الزلال الخفيف بمحقن أو ماصة باستير خلال ثقب في النهاية الصغيرة لبيض غير محضن. لاختبارات الفيروس يجب جمع الزلال من البيض خلال ٤٨ ساعة من وضع البيض. في معظم الحالات، يتم مسح الدجاجات لإفراز الفيروس باختبار الزلال للأنتيجين المحدد للمجموعة من اثنان أو ثلاثة بيضات موضوعة متتابعياً لكل دجاجة، إلا أنه قد يعتمد التعرف على الدجاجة المفردة بشكل متقطع على تكرار الاختبار وعدد البيضات المختبرة لكل دجاجة. إذا كان البيض للفقس، يمكن جمع ٠.٣ مل من الزلال بطريقة معقمة ويغلق الثقب بشمع بارافين أو شريط لاصق أو أسمنت نموذجي. لتسهيل العمل بالزلال يجب أن يخفف مرتين إلى أربع مرات في محلول يُستخدم أساساً في الاختبار. يظل أنتيجين فيروس ليكوسيس الطيور ثابتاً في زلال البيض على الأقل لمدة ٦٣ يوم عند ٨ م°.

Chickem Embryos

يرتبط عزل الفيروس من مستخلص أجنة الدجاج مع الانتقال الخلقي للفيروس، إلا أن عينات الزلال والدم ومسحات المجمع والمهبل أسهل للتداول من الأجنة. يجهز مستخلصات الجنين بضغط أجنة عمر ٩ - ١١ يوم خلال محقن ٥ مل إلى ١ مل من محلول فوسفات. يجهز المعلق ويذاب ثلاث مرات وينقى بعد ذلك بالطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ٢٠ دقيقة. يستخدم الرائق لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين.

Tumors and Other Tissues

قد تحتوي بعض الأورام كمية كبيرة من الفيروس لكن الأخرى قد لا تحتوي على فيروس بمستوى يمكن اكتشافه. تؤخذ الأورام بطريقة معقمة ويجب أن تحتبر طازجة أو مجمدة عند أو أقل من ٧٠ م°. ٥٪ - ١٠٪ من الورم المطحون في محلول ملح الفوسفات أو وسط مزرعة النسيج يمكن أن يستخدم لعزل الفيروس أو لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة، إلا أن عزل الفيروس من الورم لا يعني بالضرورة العلاقة السببية بين الفيروس والورم، كما أن كل القطعان التجارية ومعظم الدجاج في القطيع يتعرض لفيروس ليكوسيس الدجاج. يستخدم الفحص المجهرى لتشخيص وتفريق الأورام. الأنسجة الأخرى مثل العرف من الصوص حديث الفقس وأطراف الريش يمكن أن

تستخدم لكشف الأنتيجين المحدد للمجموعة، على الرغم أن اختبار هذه المواد قد قورن مع تقنيات الاختبار الأخرى فقط على مستوى ضيق (10). تجمع أطراف الريش في أنابيب تحتوي على المحلول المقرر استخدامه في الاختبار وتقطع بمكبس من التيفلون المثبت جيداً. يجب أن يعامل النسيج المقطع بالأموح فوق الصوتية أو يجمد ويذاب ثلاثة مرات قبل الاختبار. يجمع الكبد ومعظم قناة البيض من الدجاج المقتول حديثاً وتعتبر مصادر غنية بالفيروس (27).

Reticuloendotheliosis

العينات المفضلة للعزل من الدم والطحال وأنسجة الأورام المحتوية على خلية حية كاملة من الطيور عند أي عمر بأفات مشته بهها. يمكن حفظ الطعم الخلوي لعدة ساعات عند ٤ م لعدة ساعات وعند -٧٠ م أو -١٩٦ م لمدة طويلة بعد التجميد البطيء في وسط مزرعة الخلية المحتوية ١٥٪ مصلى أبقار و ١٠٪ داي ميثيل سلفوكسايد. بالرغم من إمكانية عزل الفيروس من البلازما أو مستخلص النسيج، فإن مثل هذه العينات الخالية من الخلية أقل كفاءة بالنسبة للتجهيزات الخلوية لأن الفيروس غير ثابت نسبياً ومستوى هذه التجهيزات عادة منخفض. الدم الكامل المجموع على هيارين أو الخلايا الليمفاوية الدموية هي عادة النسيج المفضل لعزل الفيروس.

لعزل فيروس ريتيكولواندوثيلوسيس من النسيج، يجمع حوالي ١ - ٢ جم من الطحال أو الورم بشكل معقم، ويوضع في ١٠ - ٢٠ مل من وسط مزرعة الخلية، ويقطع بهدوء بمشرط أو مقص حاد، ويمرر مع التكرار خلال محقن ١٠ مل يرشح خلال طبقتين من الشاش المعقم. يطرد الراشح مركزياً ويعاد تعليق ١ حجم من الخلايا المعبأة في حوالي ٩ أحجام من وسط مزرعة الخلية.

Preferred Culture Media and Substrates

Avian Leukosis

Cell Culture

على عكس فيروسات ساركوما، معظم فيروسات الليكوسيس لا تظهر تغيرات مورفولوجية في المزرعة. وبالتالي الاختبارات البيولوجية غير المباشرة مثل تثبيت المتمم (كوفال COFAL) (35)، والإليزا (9)، وخلط الأنماط الشكلية (PM) phenotypic mixing (25)، والعامل المحدث للمقاومة (RIF) resistance-inducing factor (33)، وتنشيط الخلية غير المنتجة (NP) cell activation (32) تستخدم كاختبارات لكشف فيروسات ليكوسيس الطيور. تستخدم الإليزا أكثر شيوعاً لأنها أكثر حساسية وأقل استهلاكاً للجهد عن الاختبارات الأخرى مثال كوفال وخلط الأنماط الشكلية. تتطلب هذه الاختبارات استخدام الخلايا الليفية لأجنة الدجاج مع مدى عائل نوعي (الجدول رقم ٣٤.١). اختبارات كوفال وإليزا تجرى على مرحلتين:

- (١) إكثار الفيروس في مزرعة الخلايا الليفية.
- (٢) كشف أنتيجينات فيروس ليكوسيس الطيور بالكوفال أو الإليزا.
- بالإضافة لكواشف اختبار إليزا وكوفال التي تؤخذ من مصادر تجارية متعددة، كالا الاختبارين يتطلب الكواشف النوعية التالية:
- (١) مزرعة خلية قابلة لفيروس ليكوسيس الطيور الداخلي والأنتيجين المحدد للمجموعة.
- (٢) مخزون مرجعي لأنتيجين المجموعة والذي يتم الحصول عليه من خلايا مصابة بفيروس ليكوسيس الطيور أو فيروس ساركوما.
- (٣) مضادات مصلية عالية التخصصية للأنتيجين المحدد للمجموعة لفيروسات ليكوسيس ساركوما المحضرة في الفئران الذهبية أو الأرانب (27)، الأجسام المضادة أحادية النسيلة ضد p27 ظهر أنها تحفز نوعية وحساسية الاختبار المستخدم لكشف الأنتيجين المحدد للمجموعة (14).
- (٤) مخزون معلوم لفيروسات ليكوسيس وساركوما.
- بعض هذه الكواشف يمكن الحصول عليها من مصادر تجارية.

(ALV_s)(CEF_s)

(. ,)

	A	CEF
E	A, B, C, D, J	C/E
-	A, B, C, D, J, E	C/O
A, E	B, C, D, J	C/A, C/E
A	B, C, D, J, E	C/A

^A C/E = خلايا مقاومة تحت المجموعة E من فيروسات L/S.

C/O = خلايا قابلة لكل المجاميع التحتية فيروسات L/S.

C/A = خلايا مقاومة تحت المجموعة A من فيروسات L/S.

^B لأن alv₆ لها خلفية خط O، فإن الخلايا أيضاً مقاومة تحت المجموعة E (الداخلي) لفيروس ليوكوزيس الطيور.

Reticuloendotheliosis

Cell Culture

من خلال تنمية الطعم الخلوي لمدة ٩ - ١٤ يوماً في مزارع ليفية من الطيور وإظهار الأنتيجينات الفيروسية

أو النسخ العكسي الإنزيمي.

معظم وربما كل العترات الحقلية من فيروس ريتيكولواندوثيليوسيس يمكن تمريرها بسهولة في مزارع خلية الطيور. تستعمل المزارع الثانوية طبيعياً على الرغم أن مزارع كلى الدجاج أو الخلايا الليفية لجنين البط أو الخلايا الليفية لجنين الرومي أو الخلايا الليفية لجنين السمان يمكن أن تكون مناسبة أيضاً. لأن فيروسات ريتيكولواندوثيليوسيس يمكن أن تنتقل رأسياً، ويجب أن تكون الأجنة من أمهات خالية من الإصابة. خط خلية QT-35 المكون من الخلايا الليفية المحورة كيميائياً من طائر السمان أيضاً قابل للإصابة (8).

للعزل الأولي تحقن المزارع غير المصروفة في الأطباق ٣٥ ملم أو ٦٠ ملم والمكونة لطبقات وحيدة منفصلة عادة خلال ٦ - ٢٤ ساعة بعد الفرد بكمية ٠,١ مل من عينة الاختبار الخلوية، ويجب أن تحقن العينات الخالية من الخلية إلى المزارع المصروفة المضاف إليها الوسط بعد الادمصاص لمدة ٣٠ دقيقة. تبقى المزارع لمدة ٧ - ٩ أيام عند ٣٨ م مع أول تغيير للوسط بعد ٢٤ ساعة والتغيرات التالية على فترات من ٢ - ٣ أيام. يتم التمير الثاني بوضع السائل الرائق في مزرعة جديدة محفوظة في طبق ٣٥ ملم (٠,٥ مل لكل طبق) أو طبق ٩٦ حفرة (٠,١ مل لكل حفرة)، التي تحفظ لمدة ٥ - ٧ أيام أكثر.

تشمل الضوابط مزارع محقونة بنماذج أصلية prototype غير معيبة للفيروس مثل عترة T أو CS ومزارع غير محقونة. من الحكمة أن تستعمل عدة مزارع غير محقونة توضع عشوائياً بين مزارع الاختبار لرصد الانتشار الطارئ لفيروس ريتيكولواندوثيليوسيس الذي يمكن أن يكون مشكلة إذا لم تُتداول المزارع بحرص.

Agent Identification

Physiochemical Properties

Avian Leukosis

تحتوي فيروسات ليكوسيس/ساركوما الطيور على حمض نووي ريبوزي مفرد الشريط (27). هذه الفيروسات حوالي ٦٠٪ بروتين بالوزن ويكون مكوناً للبروتين الداخلي وإنزيم النسخ العكسي وبروتينات الغلاف. يشق حوالي ٣٥٪ من الدهون من غشاء الخلية و٤٪ يكون نشويات مصاحبة للغلاف البروتيني. الجاذبية النوعية للفيروس هي ١,١٦. هذه الفيروسات حساسة لمذيب الدهون ودرجة الأس الهيدروجيني المنخفضة وعالية المقاومة للإشعاع فوق البنفسجي (27). لأنها غير ثابتة حرارياً، فإن الحفظ طويل الأمد بدون فقد للإمراضية يكون محتملاً فقط عند أقل من -٦٠ م. مورفولوجياً تقسم فيروسات ليكوسيس/ساركوما كجزئيات المجموعة C بقطر ٨٠ - ١٠٠ نانومتراً. أعضاء هذه المجموعة لا يمكن تفريقها على أسس التركيب الدقيق. تحتوي فيروسات ليكوسيس/ساركوما الطيور على الإنزيم النسخ العكسي الفريد مصلياً، ويكتشف الأنتيجين المحدد للمجموعة بواسطة تثبيت المتمم أو الإليزا. بناءً على خواص البروتينات النشوية للغلاف الفيروسي، تشمل أعضاء مجموعة

ليكوسيس/ساركوما فيروسات ليكوسيس الطيور من الدجاج ويقسم إلى خمسة أنماط A و B و C و D و E (27). بالإضافة إلى ذلك فإن فيروس ليكوسيس الطيور الخارجي المعزول من الدجاج اللاحم يتميز من فيروسات المجاميع من A حتى E ويقسم كنموذج أصلي لمجموعة جديدة (J) لفيروس ليكوسيس الطيور (26). مغايراً لفيروسات اللوكيميا الحادة لمجموعة ليكوسيس/ساركوما، فإن فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (المنتمية إلى المجموعات A و B و C و D و J) وفيروسات ليكوسيس الطيور الداخلية (مجموعة E) غير معيبة وتفتقر إلى إحداث الأورام في العائل (27).

عديدات الببتيد التركيبية (p10, p12, p15, p19, p27) تشترك في كل أعضاء مجموعة ليكوسيس/ساركوما لفيروسات الطيور السرطانية التي تشمل فيروسات ليكوسيس الطيور الداخلية والخارجية، و p27 هو الأكثر كثافة. اعتمدت التقنيات لاكتشاف الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور كثيراً على الاختبارات للفيروس أو أنتيجين الفيروس علاوة على اختبارات الجسم المضاد.

بالإضافة إلى اختبارات إيزا وتثبيت المتمم، ويمكن استعمال طرق الصبغ المناعي الخلوي الكيميائي مثل التآلق المناعي أو الإنزيم المناعي المضاد لبيروكسيداز أو الذهب المحمل ببروتين A لاكتشاف الأنتيجين المحدد المجموعة المرتبط مع جزيئات فيروس ليكوسيس الطيور في قطاعات من أنسجة مختلفة (20, 27). أيضاً تتطلب هذه الطرق استعمال الجلوبيولين المناعي G المضاد ل p27 النوعي.

اختبار إيزا المباشر أو اختبار تثبيت المتمم يمكن أن يستعمل لاكتشاف الأنتيجين المحدد للمجموعة في عينات الزلال من مسحات المجمع أو المخاط أو الدم الكامل أو بصيلات الريش. تفضل الإليزا على اختبار تثبيت المتمم لاختبار العينات الغنية بالفيروس مثل مسحات المجمع والمخاط والدم غير مناسبة للاختبار بتثبيت المتمم بسبب النشاط المضاد للمتمم (17).

Reticuloendotheliosis

خواص فيروس ريتيكولونديوثيلوسيس تكون مثالية للفيروسات السرطانية (46). الفيروس حوالي ١٠٠ نانوميتر ويتبرعم من غشاء البلازما. حزام الجزيئات عند ١.١٦ - ١.١٨ جم/سم^٣ في متدرج السكروز. محين الحمض النووي الريبي لتكاثر العترات المؤهلة حوالي ٩ كيلو قاعدة. تعزل عديدات الدهون المتعددة شاملة اثنان من البروتينات النشوية (gp90 and gp20) وخمسة أخرى (p10, p12, pp18, pp20, p30)، منها p30 يمثل الأنتيجين المحدد للمجموعة الرئيسية. تحتوي الجزيئات أيضاً على الإنزيم الناسخ العكسي.

Biological Identification**Avian Leukosis**

يتكون اختبار الإليزا من مرحلتين وهما تنمية الفيروس في مزرعة خلايا أجنة الدجاج الليفية واختبار وجود فيروسات ليكوسيس الطيور باختبار السائل الرائق للأنتيجين محدد المجموعة بواسطة الإليزا. لتنمية فيروسات ليكوسيس الطيور الخارجية (مجموعات A و B و C و D و J)، تستعمل مزرعة مزرعة خلايا أجنة الدجاج الليفية المقاومة للمجموعة E (خلايا C/E). لقياس الفيروسات الداخلية تستخدم الخلايا القابلة للإصابة بالمجموعة E لفيروس ليكوسيس الطيور.

- (١) علق الخلايا في وسط مزرعة الخلية عند تركيز 2.5×10^6 /مل.
- (٢) أضف داي ميثيل أمينو إيثيل-دكستران (DEAE - dextran) أو بولي برين إلى معلق الخلية إلى تركيز نهائي ٢ ميكروجرام/مل.
- (٣) انقل ٢ مل من معلق الخلية إلى أطباق ٣٥ ملم، ويمكن استخدام أطباق مزرعة أخرى مناسبة مثل أطباق مزرعة الخلية ٢٤ أو ٤٨ حفرة.
- (٤) اختبر طبقاً لكل عينة بالإضافة إلى طبق لكل تخفيف من الفيروس الضابط تحت المعايير (عادة ٦ أطباق، من 10^{-1} إلى 10^{-6}) للنموذج الأصلي لفيروس ليكوسيس الطيور، مثل فيروس -١ المرتبط بفيروس راوس (RAV-1) في حالة اختبار مجموعة A. في حالة اختبار عينات مجهولة، يوضع أيضاً طبقان لكل المجموع الأخرى (B و C و D و J).
- (٥) في اليوم التالي أضف ١٠٠ ميكروليتر من العينة المراد أن تختبر إلى وسط مزرعة الخلية في الطبق المقابل، ويمكن أيضاً أن تضاف العينات إلى الأطباق في نفس اليوم التي زرعت فيه الخلايا. قلب الطعم إلى الوسط بالتدوير الهادئ لكل حامل أطباق.
- (٦) غير الوسط بعد إضافة العينات بحوالي ٢٤ ساعة.
- (٧) اضغط المزارع لمدة ٧ - ٩ أيام بعد الحقن. التغيير الثاني للوسط ليس ضرورياً في حالة حفظ المزارع لسبعة أيام فقط.
- (٨) إذا كان هدف الاختبار هو لعزل الفيروس، اجمع ١ مل من الرائق من كل أطباق الاختبار إلى أنابيب معقمة واحفظها عند -70° م حتى توافر نتائج الإليزا.
- (٩) أضف ٨٠ ميكروليتر من ٥٪ توين-٨٠ لكل طبق ٣٥ ملم، وجمد وأذب معلق الخلية مرتين قبل الاختبار للأنتيجين محدد المجموعة لفيروس ليكوسيس الطيور بالإليزا. لا اختبار الأنتيجين محدد المجموعة بالإليزا، تتوفر أطباق الإليزا سابقة التغطية أو أطقم الكشف من مصادر تجارية مختلفة ويمكن أن تحضر الأطباق أيضاً في

- المعمل باستخدام الجلوبيولين المناعي IgG المضاد لـ p27 والمحضر في الأرناب. أضف ١٠٠ ميكروليتر من تخفيف ١:١٠٠٠٠ (أو كما أوصى بواسطة المصنع) من الجلوبيولين المناعي السابق في محلول كربونات (بي إتش = ٩.٤) لكل حفرة لأطباق الإليزا. حضن الطبق عند درجة الغرفة (٢٥ م) طوال الليل وبعد ذلك احفظه عند ٤ م، ولا يجب أن تحفظ الأطباق المغطاة في المعمل لأكثر من ١٠ أيام. في حالة اختبار العينات بأطقم إليزا التجارية اتبع التعليمات وإلا يوصى بالطريقة العامة الآتية لإليزا فيروس ليكوسيس الطيور.
- (١٠) اسكب المحلول المغلف واصرف الأطباق، واغسلها ٣ مرات بواسطة محلول ملح الفوسفات المحتوي على ٠.١٪ توين-٨٠.
- (١١) لتقليل الارتباط غير النوعي وبالتالي الخلفية العالية، يمكن إضافة محلول ملح الفوسفات المحتوي على ١٪ زلال مصال الأبقار أو ١٠٠ ميكروليتر من ٥٪ لبن مجفف منزوع الدسم فوري التحضير (23) لكل حفرة لإغلاق السطح المتفاعل قبل إضافة عينات الاختبار إلى الأطباق، واتركه لفترة ٣٠ دقيقة عند ٢٥ م.
- (١٢) أضف ١٠٠ ميكروليتر من مادة الاختبار لكل حفرة في طبق الإليزا. شاملاً في كل طبق حفر لعينات معلومة إيجابية وسالبة وأيضاً ضابط للقراءة.
- (١٣) حضن لفترة ساعة عند ٣٨ - ٤٠ م.
- (١٤) بجرص اسكب المادة من الأطباق وجفف واغسل ثلاث مرات بمحلول ٠.١٪ توين-٨٠ في PBS.
- (١٥) أضف ١٠٠ ميكروليتر من (الجلوبيولين المناعي مضاد p27 المحضر في الأرناب والمقترن مع إنزيم بيروأكسيداز) لكل حفرة. يجب تحديد تخفيف المقترن بالمعايرة أو كما يوصي المصنع.
- (١٦) حضن لمدة ساعة عند ٣٨ - ٤٠ م.
- (١٧) اسكب المقترن وجفف الطبق واغسل ثلاث مرات.
- (١٨) أضف ١٠٠ ميكروليتر من المادة المتفاعلة مع الإنزيم حديثة التحضير، مثل ٥-أيمو حمض ساليك في ٢، ومحلول فوسفات جزئي (بي إتش = ٧)، ويجب أن يتكون تفاعل اللون خلال ٣٠ دقيقة.
- (١٩) اقرأ الامتصاص عند ٤٩٠ نانومتراً في قارئ إليزا أو مقياس الطيف الضوئي آخر مناسب.
- (٢٠) العينات التي لها قيم امتصاص ٢، ووحدة فوق قيم العينات المعلوم سلبيتها تعتبر إيجابية.

Phenotypic Mixing test (PM): يتطلب خلايا قابلة للإصابة بفيروسات

مجموعة A و B و C و D و J (خلايا C/O) وخلايا C/E ومخزون فيروس راوس/ساركوما (RAV-O). يجب أن تكون الخلايا من أجنة خالية من فيروس ليكوسيس الطيور الخارجي والداخلي.

لتنمية الفيروس و خلط الأنماط ، ينمى ليكوسيس الطيور معاً مع راوس /ساركوما تحت ظروف ملائمة للخلط النمطي كالتالي :

- (١) جهز مزارع C/O الثانوية. تعلق الخلايا في وسط مزرعة الخلية المعامل بـ DEAE-dextran كما وصف سابقاً.
- (٢) أضف فيروس راوس /ساركوما RAV-O إلى التركيز 2×10^6 وحدة مكونة للبقع /مل.
- (٣) انقل ٢ مل من معلق الخلايا بـ فيروس راوس /ساركوما RAV-O إلى أطباق ٣٥ مل ، واختبر طبقاً لكل عينة بالإضافة إلى طبق لكل تخفيف لـ فيروس ليكوسيس الطيور المطلوب معايرته وعادة $10^{-1} - 10^{-6}$ وطبقين للخليط راوس /ساركوما إضافي RAV-O (لم يحقن مع ليكوسيس الطيور أو العينات).
- (٤) في اليوم التالي ، غير وسط مزرعة النسيج خلال ساعتين ، وأضف ١٠٠ ميكروليتر من المواد المراد اختبارها في كل طبق.
- (٥) عند ١ - ٢ يوم بعد الحقن غير الوسط.
- (٦) احفظ المزرعة من ٥ - ٧ أيام بعد الحقن وعندما تكون الأطباق مساحات بؤرية واضحة لـ فيروس راوس ساركوما RAV-O الذي يحدث التحور. اجمع الرائق من الأطباق المختبرة والضابطة واطرد مركزياً عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة لترسيب كل الخلايا.
- (٧) يجب اختبار السوائل الراقية لـ فيروس ليكوسيس الطيور مباشرة بعد الجمع أو تخزين عند -70° م حتى تختبر. في الاختبار وجود فيروسات راوس ساركوما المختلطة نظياً ، وفيروسات راوس ساركوما التي لها غلاف فيروس ليكوسيس الطيور يجب أن تكتشف في نظام لا يكتشف فيروسات راوس ساركوما RAV-O ، التي هي في خلايا مقاومة وراثياً إلى مجموعة E من فيروس L/S.
- (٨) جهز مزارع خلايا أجنة الدجاج الليفية الثانوية C/E المعالجة بـ DEAE-dextran.
- (٩) انقل ٠.٥ مل من الرائق المجموع من المزارع المستخدمة في مرحلة نمو الفيروس إلى مزارع حديثة الزرع أو مزارع ٢٤ ساعة (C/E) في أطباق ٣٥ ملم.
- (١٠) في اليوم التالي ، تخلص من الوسط السائل واستبدله بوسط تغطية يحتوي ٠.٧% آجار وبعد ٢ - ٣ أيام من التغطية ، وقد يضاف ١ مل من وسط مزرعة النسيج بدون مصلى عجول مدعم إلى الأطباق.
- (١١) احفظ الأطباق ٥ - ٧ أيام بعد الحقن ، وافحص الأطباق لبؤر فيروسات راوس ساركوما. أي طبق يظهر بؤراً يعتبر إيجابياً لـ فيروس ليكوسيس الطيور.
- (١٢) في حالة تنمية فيروس ليكوسيس الطيور لتوصيف أكثر ، تحفظ عينة من مواد الاختبار عند -70° م حتى الحصول على نتائج اختبار الخلط النمطي. في الحالات الإيجابية يعزل الفيروس وينمى على مزارع C/E CEF.

Complement Fixation: يجرى اختبار كوفال على مرحلتين كتنمية

الفيروس وتحليل الأنتيجين بواسطة اختبار تثبيت المتمم. يستخدم لتكاثر الأنتيجين يستخدم خلايا أولية أو ثانوية C/E تفقر إلى الفيروسات. يتطلب الاختبار محلل الدم ومتمماً من خنزير غينيا ومضاد مصلل لأنتيجين فيروس ليكوسيس الطيور المحدد للمجموعة. تم وصف طريقة معايرة المكونات السابقة لعمل اختبار كوفال (44).

Resistance-Inducing Factor Test: عند إصابة خلايا CEF_s بفيروس

ليكوسيس الطيور، وتصبح الخلايا مقاومة للتحوّل الذي يحدث بواسطة فيروس ساركوما الطيور من نفس المجموعة (33). أُستخدمت هذه الخاصية للتنافس كثيراً لاختبار فيروس ليكوسيس الطيور بواسطة اختبار RIF وأيضاً في تحديد مجموعة الفيروس (27). عندما يكون عدد البؤر الذي يحدث بواسطة عدداً قياسياً من فيروس ساركوما الطيور على الخلايا المختبرة حوالي ١٠٪ أو أقل من عدد البؤر في حالة الخلايا الحساسة المقارنة يدل ذلك على وجود فيروس ليكوسيس الطيور. ويجب أن يشمل كل اختبار تجربة مقارنة موجبة وسالبة.

Non-producer Cell Activation Test: يتطلب هذا الاختبار (32) الخلايا

غير المنتجة التي تحورت بواسطة العترة المعيبة defective strain لفيروس RSV (Bryan high titer strain) والتي لا تنتج فيروساً قابلاً للكشف في الاختبارات المعتادة على خلايا C/E. استخدمت خط خلية السمان الياباني المتحوّل بواسطة عترة برايان ناقصة الغلاف لفيروس RSV (R(-)Q) كمصدر لجين فيروس ساركوما الطيور. تحقن عينات الاختبار على خلايا قابلة وراثياً وخالية من الفيروس، وبعد ذلك تزرع مشاركة مع الخلايا غير المنتجة. تختبر المزرعة المصابة بفيروس ليكوسيس الطيور باختبار الرائق في المزارع أو في أجنة الدجاج لوجود فيروس ساركوما الطيور. فيروس ليكوسيس الطيور وخلايا C/E تزرع مشاركة مع خلايا (R(-)Q) خارجياً، ويتم تقييم الرائق على خلايا C/E، كما يمكن أيضاً استخدام خلايا (R(-)Q) في التقييم داخلياً مع فيروس ليكوسيس الطيور وكذلك في تقييم العامل المساعد في الصوص (27).

()

Transformation (Focus) Assay for Sarcoma Viruses

تحوّل فيروسات ساركوما الطيور الشكل المغزلي المسطح لخلايا CEF_s إلى بؤر كروية وانعكاسية والتي يمكن عدها بالفحص المجهرى للمزارع (27). تكوين البؤرة بفيروس راوس ساركوما أفضل ما يشاهد في المزارع السابق تنميتها في قاعدة وسط ١٩٩ ووسط F-10 شوربة فوسفات تربتوز مصلل عجل وبيكربونات الصوديوم. تحقن مزارع

CEF وحيدة الطبقة القابلة للإصابة وراثياً، وفي اليوم التالي يسكب الوسط ويستبدل بأجار التغطية (انظر اختبار الخلط النمطي). يجب فحص المزرعة يومياً للبوأر المحدثة بفيروس راوس ساركوما والذي يتطور عادة خلال ٤ - ٧ أيام بعد الحقن.

Chicken Embryos

يمكن استخدام أجنة الدجاج المهيأة وراثياً لاختبار فيروس ليكوسيس الطيور وأيضاً فيروسات ساركوما الطيور عن طريق الحقن بالوريد أو كيس المح وتفقس الأجنة كصيغان طبيعية وتتكون الأورام فيما بعد مثل سرطان خلايا الدم الأم erythroblastosis والليكوسيس الليمفاوي (27). تحدث فيروسات ساركوما الطيور بقعاً على الغشاء الكوريوالانتويس ٨ أيام عقب الحقن. عادة تموت الأجنة المحقونة وريدياً بفيروسات ساركوما من الورم السرطاني والأنزفة خلال ٤ - ٥ أيام (27).

Chickens

يستخدم للقياس داخل الجسم لفيروسات ليكوسيس الطيور ويجب أن يكون خالياً من الإصابة الفيروسية وقابلاً وراثياً لنمو الفيروس وتكوين الورم. الحقن البطني أو الوريدي للصوص عمر يوم القابل للإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور عادة يؤدي لتطور الليكوسيس الليمفاوي وأيضاً الأورام الأخرى (27). يعتمد الوقت المطلوب للقياس على الاستجابة المطلوب قياسها وطريقة القياس لمثل هذه الاستجابة. على سبيل المثال الاستجابة لليكوسيس الليمفاوي خلال ٣٦ أسبوعاً اعتماداً على الآفات التشريحية والنفوق بينما يمكن قياس هذه الاستجابة عند ١٦ - ١٨ أسبوعاً على أساس الفحص التشريحي والمجهري لبيرسا فايريبي. عامة يمكن تقليص الفترة المطلوبة لحدوث المرض مثل سرطان خلايا الدم في حالة حقن الدجاج أثناء الحياة الجنينية (27).

على عكس فيروسات ليكوسيس الطيور، فإن فيروسات ساركوما لا توجد في تجمعات الدجاج تحت الظروف الطبيعية. أكثر الطرق شيوعاً لقياس هذه الفيروسات هو الحقن تحت الجلد في الجناح في دجاج من ٤ - ٦ أسابيع. تتكون عادة أورام محسوسة خلال ٧ - ١٤ يوماً عند موضع الحقن. تتطور هذه الأورام بشدة وتنتشر مؤدية إلى قتل العائل أو تنحدر تدريجياً تاركة مظهراً طبيعياً للجناح ويعرف هذا الانحسار بأنه يتأثر بالعمر والنوع الجنيني وجرعة الفيروس. الدجاج الذي يقاوم الأورام الحادثة بفيروس راوس ساركوما قد يتطور إلى ليكوسيس ليمفاوي لأن فيروسات ليكوسيس الطيور يشارك التواجد في معظم مخزون فيروس ساركوما. الحساسية تكون أفقر بعد ١٤ يوماً بمعظم الطرق وعلى الرغم من أن التركيزات العالية للفيروس قد تكتشف بعد فترات أقصر وقد تتواصل نقطة نهاية الاختبار بالإليزا خلال ٨ - ٩ أيام.

Reticuloendotheliosis

توجد طرق عديدة لتوضيح فيروسات راوس ساركوما في مزارع الخلية، إلا أن توضيح الأنتيجينات بواسطة اختبارات التآلق المناعي أو الإليزا هي الوسائل صاحبة الاختبار.

Immunofluorescence

يحصل على المصل المضاد الإيجابي لفيروس راوس ساركوما بسهولة من دجاج متمائل للشفاء (29)، والمقترن المناعي مضاد لمصل الدجاج مع صبغة فلورسين يتوافر تجارياً والبديل هو استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة للفئران (11) والمضاد المقابل لها. تنمى العينة على خلايا CEFs وحيدة الطبقة على أطباق ٩٦ حفرة أو أطباق ٣٥ ملم أو على أغشية زجاجية ثم تصرف وتغسل بمحلول ملح الفوسفات وتثبت لمدة ٥ دقائق في خليط من ستة أجزاء أسيتون وأربعة أجزاء كحول ٩٥٪ وتجفف بالهواء. تصبغ فوراً أو تحفظ عند -٢٠ م حتى تختبر. للصبغة يستخدم التقنية القياسية للتآلق المناعي. للمقارنة توضع ضوابط إيجابية وسالبة. يسهل استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة الحكم على الاختبار لوضوح الصبغة النوعية وغياب الخلفية.

Enzyme Immunoassay

يعتمد هذا الاختبار على الأجسام المضادة وحيدة النسيلة التي تم وصفها (12). تغطى أطباق الإليزا بخليلط من جسم مضاد وحيد النسيلة 11A25 و11C237 كل عند تخفيف ١: ١٠٠٠ في محلول التغطية وتحضن الأطباق طوال الليل عند درجة الغرفة (انظر اختبار ELISA-ALV). عند الاختبار تعالج الحفر بكمية ٠.١ مل من العينات عقب دورتين تجميد وإذابة لإطلاق الأنتيجين. يشبه الاختبار تلك الطريقة الموصوفة سابقاً باستخدام تخفيف مناسب من مصل الأرنب المضاد لفيروس راوس ساركوما والمقترن المناعي IgG المضاد لمصل الأرنب والمعلم مع إنزيم بيروأكسيداز كأجسام مضادة أولية وثانوية على التوالي.

يمكن أن يحضر مصل الأرنب بحقن الأرنب تحت الجلد عند مواضع متعددة بكمية ٢ مجم من بروتين منقى من عترة T للفيروس بطريقة تدرج السكروز والمخفف في المحسن المناعي غير الكامل لفرويندز ويتبعها عند ٢١ و ٣٥ و ٤٩ يوماً بجرعات تنشيطية. يجمع المصل عند ٦٣ يوماً ويعرض للادمصاص مقابل خلايا CEF الطبيعية وبودرة كبد الدجاج المحفف بالأسيتون حتى تفسل في التفاعل مع خلايا الدجاج الطبيعية.

Complement Fixation

تؤخذ الخلايا من مزارع بعد الحقن بحوالي ١٤ يوماً وتختبر لانتيجين فيروس راوس ساركوما النوعي باختبار تثبيت المتمم لفيروس راوس ساركوما الطيور (COFAR) (38). المضاد المتخصص specific anti-REV لفيروس راوس ساركوما يمكن الحصول عليه من الأرانب المعامل مناعياً بالفيروس النقي وتثبيت المتمم يجرى بوسيلة عادية (انظر اختبار COFAL).

Reverse Transcriptase

الخلايا من مزارع بعد الحقن بأسبوعين يمكن أن تستخدم أيضاً لهذا الاختبار (34). يجب استبعاد أمراض أخرى قبل إجراء هذا الاختبار في الطيور مثل فيروس ليكوسيس الطيور في الدجاج أو فيروس أنكورنا النوع C في الفزان أو مرض التكاثر الليمفاوي الفيروسي في الرومي (LPD) (4)، لأن هذه الفيروسات السابقة تحتوي على الأنزيم الناسخ العكسي.

Cytopathic Effect

خلال ٥ - ٧ أيام من التمرير الأولي لفيروس راوس ساركوما، قد يشاهد تأثير مرضي خلوي قليل الدرجة (ليس دائماً)، ونادراً ما يبلغ هذا التأثير فقط الذروة في التدمير الكلي للمزرعة (42). حديثاً استخدم اختبار الإنزيم المناعي للبقع، وأظهر أنه حساس وطريقة معتمدة لكشف فيروس راوس ساركوما والجسم المضاد (6). مع أن فيروسات راوس ساركوما المعيوبة لم يتم التعرف عليها في السلالات الحقلية إلا أن ذلك لا يعني أنها غير موجودة. عزل سلالات جديدة معيبة قد يحتاج طرقاً خاصة مثل التحويل الخارجي لخلايا نخاع العظم أو عدوى أجنة الطيور. سلالة T المعيبة يمكنها أيضاً تحفيز بؤر الخلايا المحورة في مزارع أجنة السممان (21) والتي يمكن أن تشارك كطريقة تقييم.

Molecular Identification

Avian Leukosis

يمكن استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل النوعي لمجموعة A لفيروس ليكوسيس الطيور لاكتشاف الحمض النووي دي إن إيه والحمض الفيروسي آر إن إيه في الأنسجة المختلفة من دجاج مصاب بفيروس ليكوسيس الطيور (45). يستخدم تفاعل البلمرة بوائى تعتمد على تتابع تكرار النهايات الطويلة لنموذج الفيروس (LTR) proviral long terminal repeat عند النهاية 3' منطقة (U3) وتلك التتابعات المتبقية U5 يمكن أن تستخدم

لكشف الفيروس الخارجي وليس الداخلي لفيروسات ليكوسيس الطيور (E. J. Smith, press. comm.). النموذج الفيروسي لحمض دي إن إيه من خلايا CEFs مصابة أو أورام سوف يتجهجن مع المسابير الخاصة مثل pRAV-2 ويمكن أن يكتشف بواسطة اختبار الشف النقطي أو شف ساوثرن (27).

Reticuloendotheliosis

تفاعل البلمرة المتسلسل الذي يعظم تتابع ٢٩١ قاعدة زوجية منتجة لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس (REV LTR) أظهر حديثاً أنه طريقة حساسة ونوعية لكشف العترات المختلفة لفيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس في خلايا CEFs المصابة وكما في الدم والأورام من الطيور المصابة (1, 13). يمكن أن يستخدم تفاعل البلمرة وتفاعل البلمرة مع الإنزيم العكسي الناسخ أيضاً في كشف فيروس ريتيكلوإندوثيليوسيس في اللقاحات الملوثة (19, 30, 41). نموذج حمض دي إن إيه من مزارع الخلية أو الأورام سوف يتزوج مع المسابير النوعية مثل pSNV ويمكن أن تكتشف بواسطة الشف النقطي أو تحليل شف ساوثرن (46). مثل هذه الاختبارات لها نوعية قوية ويجب أن تكون مساندة في تأكيد تشابه المعزولات الافتراضية.

Serologic Detection in the Host

Avian Leukosis

Virus-Neutralization (VN)

هو اختبار أكثر حساسية يستخدم لتحديد الجسم المضاد النوعي للمجموعة لفيروسات L/S في الدجاج. يمكن أن يحضر مخزونات فيروس راوس ساركوما وفيروس ليكوسيس الطيور بحقن مزارع CEF القابلة للإصابة. تزرع المزارع المصابة مرة تالية أو تنقل السوائل الراكثة إلى مزارع جديدة تستخدم لزيادة مستوى الإصابة. تجمع السوائل الراكثة من مزارع CEF مجهزة من أجنة مصابة وراثياً بفيروس ليكوسيس الطيور ويمكن أن تستخدم كمصدر لفيروس ليكوسيس الطيور. يمكن أن تستخدم الأورام المتكونة في الجناح أو عضلات الصدر كمصدر لفيروس راوس ساركوما (27). مضادات المصل النوعية المرجعية للمجموعة لفيروس راوس ساركوما يمكن أن تجمع من دجاج به أورام متضائلة محدثة بواسطة فيروس معين. يمكن أن يحضر الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور بحقن دجاج عمر ٤ - ٦ أسابيع قابل للإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور معين، ويمكن حصد الأمصال عند ٦ - ١٦ أسبوعاً بعد الإصابة معتمداً على النوع الجيني للدجاج وعرة الفيروس المستخدم.

يقاس الجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور بتفاعله مع فيروس راوس ساركوما، ويتحدد تعادل الفيروس بواسطة أي طريقة تقييم لفيروس راوس ساركوما (مثلاً في الدجاج أو أجنة الدجاج أو مزرعة الخلية)

- (27). يمكن أن يستعمل أيضاً اختبار التعادل الدقيق الذي يستخدم فيروس ليكوسيس الطيور كفيروس كاشف (16). يمكن أن يجرى الاختبار في أطباق ٩٦ حفرة ويتحدد تعادل الفيروس بالإليزا على سوائل المزرعة.

Rous Sarcoma Virus-Focus Reduction Assay

هذا الاختبار لمضادات فيروس L/S يجرى على النحو التالي :

- (١) يخفف السيرم بنسبة حجم واحد إلى خمسة أحجام ويجرى له عدم تنشيط لمدة ٣٠ دقيقة على درجة حرارة ٥٦° م في حمام مائي.
- (٢) يتم تقدير تخفيف RSV الذي يعطي حوالي ١٠٠ أو ١٥٠٠ وحدة تكوين بؤري للفيروس على التوالي، وعندما تعد البؤر بالعين المجردة أو ميكروسكوبياً. مجهز RSV الذي يتم الشغل به بعد ذلك يجب أن يكون تركيزه ضعف التركيز المقدر في الخطوة الثانية. على سبيل المثال، إذا كان التخفيف ٢٠٠:١ يعطي ١٠٠ بؤرة لكل طبق فإن المجهز الذي يجب الشغل عليه يجب أن يكون بمعدل تخفيف ١:١٠٠.
- (٣) اخلط أحجاماً متساوية من مجهز RSV مع السيرم غير النشط وحضن المخلوط على درجة ٣٧° م لمدة ٤٠ دقيقة.
- (٤) قيم المتبقي من الفيروس في مزارع CEF الحساسة.
- (٥) اعمل تجربة مقارنة موجبة وأخرى سالبة للسيرم.
- (٦) سجل عدد البؤر RSV عند اليوم السابع. عينة السيرم التي تقلل عدد البؤر بحوالي ٩٠٪ أو أكثر بالمقارنة سالبة السيرم تعتبر ايجابية لمضادات الأجسام antibody. السيرم السالب يجب أن يفشل في تثبيط الفيروس وهنا عدد البور يجب أن يقارن بالعدد في المقارنة التي تحوي فيروساً فقط.

Microneutralization-ELISA -

يجرى على مرحلتين: تعادل الفيروس ومعايرة فيروس ليكوسيس الطيور المتبقي في سوائل المزرعة بواسطة الإليزا.

تعادل الفيروس يجرى كالتالي :

- (١) تعامل الأمصال لمدة ٣٠ دقيقة عند ٥٦° م، وخفف الأمصال ١:٥ في وسط مزرعة الخلية بدون مصل.
- (٢) حدد تخفيف فيروس ليكوسيس الطيور الذي يعطي ٥٠٠ - ١٠٠٠ وحدة معدية من الفيروس /مل. استعمل RAV-2 و RAV-49 و RAV-50، محطة بحوث هاوتون (HPRS-103) أو RAV-O لمعايرة الجسم المضاد لفيروس AL المجاميع A أو B أو C أو D أو J أو E على التوالي.

- (٣) أضف ٥٠ ميكروليتراً من الفيروس المجهز لكل حفرة في طبق معايرة دقيق عدا ٣ - ٥ حفر لتستخدم كضوابط للخلية.
- (٤) أضف ٥٠ ميكروليتراً من المصل المراد اختباره المثبط والمخفف إلى الحفر، واخلط المصل مع الفيروس بسحب محتويات الحفرة إلى الماصة من مرتين إلى ثلاث مرات.
- (٥) توضع أمصال إيجابية وسلبية ضابطة.
- (٦) حضن الأطباق عند ٣٧ م لمدة ٤٠ دقيقة.
- (٧) أضف ٥ x ١٠^٤ CEF_s، ويجب أن تكون الخلايا خالية من الفيروس الداخلي والأنتيجين.
- (٨) حضن الأطباق لمدة أسبوع بدون تغيير الوسط.
- (٩) أضف ٢٠ ميكروليتراً من ٥٪ توين ٨٠ لكل حفرة، وجمد وأذب على الأقل مرتين قبل اختبار السائل الرائق بواسطة الإليزا. لمعايرة فيروس ليكوسيس الطيور المتبقي، انظر الفقرة عن معايرة أنتيجين فيروسات ليكوسيس الطيور محدد المجموعة بالإليزا. النتيجة السلبية تدل أن المصل موجب للجسم المضاد لفيروس ليكوسيس الطيور، والإليزا الإيجابية تدل على أن المصل سالب للجسم المضاد. تطورت الإليزا المباشرة لفيروس ليكوسيس الطيور (الجسم المضاد) (37) قد تحدث النتائج السلبية الوهمية نتيجة التفاعلات التصالبية، وخاصة إذا كان الجسم المضاد للفيروس الداخلي موجود.

Reticuloendotheliosis

تأكيد هذه الإصابة بالطرق المصلية تضم تقييم الأمصال من طيور معرضة طبيعياً في قطيع مشتبه. تحت الأجسام المضادة بتكرارات مختلفة وتظل لأزمة مختلفة. الطيور المصابة وراثياً أو المحقونة بجرعات عالية مثل الأجنة قد تكون حاملة للفيروس بشكل دائم وتفشل في تكوين أجسام مناعية. يجب أن تختبر على الأقل ١٠ - ١٥ مصلاً لكل مجموعة أو قطيع، ولا يوصى بجمع الأمصال في مصل واحد.

Indirect Immunofluorescence

هو اختبار مفيد لكشف فيروس راوس ساركوما (الأجسام المضادة) في الأمصال ومستخلص صفار البيض (29). تعدى أطباق مزارع CEF ٩٦ حفرة بحوالي ٥٠ - ١٠٠ وحدة مكونة لبؤرة التآلق لفيروس ريتكلوإندوثيلوسيس تنمى لفترة ٣ - ٥ أيام تحت الوسط السائل وتثبتت. تستخدم الأمصال المجهولة عند تخفيف ١ : ٢٠ في اختبار الصبغة كما وصف مبكراً في عزل الفيروس. الضوابط مع مصل عادي ومضادات مصل مغايرة على كل من المزارع المصابة وغير المصابة تكون ضرورية. الاختبارات على أمصال من أنواع طيور أخرى تتطلب مضاد جلوبيولين مقترن بالصبغة المناسبة.

Enzyme Immunoassay

يمكن استخدام الإليزا غير المباشرة في أطباق ٩٦ حفرة أيضاً لكشف الأجسام المضادة لفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس في أمصال الدجاج (39). يبدو هذا الاختبار أكثر حساسية عن التآلق المناعي أو تعادل المصل، إلا أن الأمصال يجب أن تخفف ١:٢٠٠ إلى ١:٤٠٠ لتجنب التفاعلات الإيجابية الكاذبة. تتوفر أطقم الاختبار التجارية للكشف عن الأجسام المضادة للفيروس.

Agar-Gel Precipitin Test

تكون الأمصال المحتوية على جسم مضاد من دجاج مصاب بفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس خطوط نوعية خلال ٢٤ - ٧٢ ساعة في اختبار الترسيب عندما تتفاعل مقابل الأنتيجينات المناسبة، على سبيل المثال، مستخلص مزارع الخلية المصابة، أو الرائق من مزارع الخلية المصابة المركز ١٠٠ مرة، أو بلازما الدجاج حامل الفيروس في الدم، أو جزيئات الفيروس المركزة بالطرد المركزي فائق السرعة ومناطق الكثافة المتدرجة في السكروز (22). يمكن اكتشاف أي من الأنتيجين أو الجسم المضاد في عينات الاختبار بنظام اختبار حيث يوضع فيه أنتيجين إيجابي بجانب بعض في الحفر الطرفية (22)، ويجب أن تؤكد نوعية خطوط الترسيب بواسطة تفاعلات التشابه مع الضوابط الموجبة في الحفر المجاورة.

Virus Neutralization

يستخدم لكشف الجسم المضاد عند عدم إمكانية فحص الأمصال بالتآلق المناعي غير المباشر أو عند الحاجة لتأكيد نتائج اختبارات التآلق والترسيب. يمكن استخدام أطباق ٩٦ حفرة (7). توضع تخفيفات مزدوجة ثنائية لكل اختبار ومصل ضابط في وسط المزرعة بدون مصل عجل في أطباق المعايرة بمعدل ٠.٠٥ مل لكل حفرة. يضاف لكل حفرة حجم مساوٍ من النموذج الأصلي لفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس (عترة T أو CS) يحتوي حوالي ١٦ وحدة معدية كما تحدد بالمعايرة التلقائية. بعد التحضين لمدة ٣٠ دقيقة عند ٣٧°م، يضاف CEF_s لكل حفرة ويحضان طبق لمدة ثلاثة أيام عند ٣٨°م في حضان خلايا رطب مع ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. مزارع الطبقة الواحدة في كل حفرة تثبت بعد ذلك وتصبغ بالتآلق غير المباشر كما وصف سابقاً. تؤخذ قراءات الحفر كإيجابية أو سالبة للفيروس عقب الفحص المجهرى. معيار التعادل هو أعلى تخفيف للمصل الذي يعادل فيروس الاختبار. البديل، يمكن استخدام الإليزا لمعايرة فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس المتبقي.

Differentiation from Closely Related Agents

Avian Leukosis

تتشارك فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما في أنتيجين محدد للمجموعة وبعض الخواص الفريدة مثل القابلية للتفاعل مع الأعضاء الأخرى من المجموعة في اختبارات RIF و PM وتثبيت المتعم (27). يمكن تفريق مجموعة الفيروسات هذه من الفيروسات السرطانية الأخرى للطيور مع شكل الجزيء النوع C، مثل فيروس ريتكلوإندوثيلوسيس على أسس الأنتيجين المفرد المحدد للمجموعة والنسخ العكسي الإنزيمي والكثافة ١.١٦. تقسم فيروسات L/S حسب طيف السرطانات التي تحدثها (النوع المرضي) مجاميع الغلاف الفيروسي. عرفت حالة سرطانية في الرومي بمرض التكاثر الليمفاوي التي يسببها فيروس أنكورنا آخر متميز عن ليكوسيس/ساركوما وفيروس ريتكلوإندوثيلوسيس (4).

Pathotypes

فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما الطيور التي تحدث أوراماً على مدى طويل (الفيروسات بطيئة التحور) تعرف كفيروسات ليكوسيس الطيور، بينما الفيروسات التي تسبب سرطانات حادة (خلال ٢ - ٦ أسبوع) تعرف كفيروسات ساركوما الطيور والليوكيميا المعيبة.

Subgroup and Strain Variability

تقسم فيروسات مجموعة ليكوسيس/ساركوما الطيور في الدجاج إلى ٦ مجاميع (A و B و C و D و E و J) على أسس مدى عوائلها في خلايا الدجاج المختلفة وراثياً، وتداخلها مع تحورات مزارع CEF بواسطة أعضاء فيروسات راوس ساركوما من نفس المجموعة والغلاف الفيروسي المكون للأنتيجين المكتشف باختبارات التعادل (27). المجموعة E لفيروس ليكوسيس الطيور هي فيروسات ليكوسيس الطيور داخلية في الدجاج تعرف بقلّة إمراضيتها. مجموعة أخرى من فيروسات ليكوسيس/ساركوما الداخلية عزلت من الفزان (G, F) والعصافير المجرية (H) والسمان (I) (27). العزلات المعملية والحقلية التابعة لمجموعة فيروس L/S تصطلح عادة بسلاطات المجموعة. حدوث المقاومة ووجود الدرنّة يتأثر بسلاطة الفيروسات (27).

Characteristics of Vaccine Strains

لا توجد لقاحات تجارية لحماية الدجاج من الإصابة بفيروس ليكوسيس الطيور. نتائج التحصين التجريبي بفيروس ليكوسيس الطيور الحي على إفراز الفيروس والانتقال الوراثي أو التناسلي كانت غامضة (27). استخدم

فيروسات ليكوسيس /ساركوما المكونة جينياً التجريبية كلقاحات (27, 48) قد تثبت أنها ذات قيمة للبرامج الحالية لتقليل أو مكافحة عدوى فيروس ليكوسيس الطيور.

Reticuloendotheliosis

Strain Variability

كل فيروسات ريتكلواندوثيليويسيس بغض النظر عن غموض أنواع المصدر ترتبط أنتيجينياً لبعضها البعض وتتميز مصلياً من كل فيروسات أنكورنا، إلا أن التوصيف الأنتيجيني لمعزولات فيروسات ريتكلواندوثيليويسيس المختلفة باستعمال ١١ جسماً مضاداً وحيد النسيلة (9) أثبتت وجود ثلاثة أنماط مختلفة A و B و C (7). المتلازمات المثبطة للمناعة المحثة بواسطة فيروسات ريتكلواندوثيليويسيس يمكن أن تتفرق عادة من الآفات المتكونة في مرض جمبورو أو فيروس أنيميا الدجاج بالفحص النسيجي. ضمور الأعضاء الليمفاوية مع التثبيط المناعي وآفات العصب والتطور غير الطبيعي للريش تميز المرض المثبط للمناعة المحدث بواسطة فيروسات ريتكلواندوثيليويسيس.

Characteristics of Vaccine Strains

لا توجد لقاحات ويشمل السيطرة على المرض إزالة الدجاج المفرز للفيروس من قطعان التربية وحملية النسل ضد الإصابة الأفقية خلال الرعاية الجيدة والعزل الشديد (47).

Differential Diagnosis of Avian Oncornavirus-Induced Tumors

يمكن أن تتداخل الأورام المسببة بواسطة فيروسات مجموعة ليكوسيس /ساركوما مع تلك الأمراض ذات الطبيعة التكاثرية للخلايا الليمفاوية مثل الأورام المشاهدة في مرض مارك وريتكلواندوثيليويسيس (36). بسبب انتشار فيروسات ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلواندوثيليويسيس وفيروس مارك والإصابة في غياب تكون الورم تكون شائعة فإن الصفات الفيروولوجية والمصلية نادراً ما تساند التشخيص النهائي، ويمكن أن تستخدم التقنيات المعتمدة على التهجين الجزيئي أو الكيمياء المناعية مع الأجسام المضادة أحادية النسيلة للأنتيجينات الخلوية في التشخيص المقارن. الأورام الليمفاوية الناشئة من فيروسات أنكورنا إن إيه الطيور تنشأ من إما خلايا B (ALV, REV) أو خلايا T (5, 27, 46). هذه الصفات تعطي الأساس للاختبارات التي تفرق بين أورام خلية B وخلية T باستخدام أجسام مضادة عديدة غير نوعية وأجسام مضادة أحادية نوعية لأنتيجينات سطح الخلية للخلايا الليمفاوية B و T (24).

لأن فيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس غير المعيبة لا يمتلك جين *onc*-(v) الفيروسي، فإنه لا يحور الخلايا المستهدفة بالالتحام مع جين *onc*-(v) الخلوي مثل *c-myc* مؤدياً إلى زيادة تعبير مثل هذا الجين. التعبير الزائد للجين *c-myc* يعتقد أنه يبدأ عملية جينية ليمفاوية. التغير الجزيئي هو الأسس لاختبار الحمض النووي دي إن إيه السرطاني للتشخيص النهائي الأورام الليمفاوية لفيروس ليكوسيس الطيور وفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس. باستخدام مسابير مناسبة مثل pRAV-2 أو pSNV أو *c-myc*، تستخدم تقنيات شف ساوترن والتجهين للحمض النووي دي إن إيه الخاص بالورم لاكتشاف الانزراع التناسخي لفيروس ليكوسيس الطيور وريتكلوإندوثيليوسيس (النموذج الأولي) والتغير في *c-myc* (27, 46).

حديثاً يسمح استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل باكتشاف نسختين من تكرار القاعدة الزوجية ١٣٢ في الحمض النووي دي إن إيه المستخلص من سرطانات مرض مارك لكن ليس من دي إن إيه المستخلص من السرطانات المسببة بفيروس ليكوسيس الطيور أو فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس (5). تحتوي سرطانات مرض مارك على تكرار عالي من الخلايا المصابة ونسخ أكثر لحمض دي إن إيه الفيروسي لكل خلية مصابة أكثر من الموجودة نمطياً في أنسجة الدجاج غير الحامل للمرض (5). أيضاً أوضح تفاعل البلمرة المتسلسل قدرته على اكتشاف تتابعات فيروس ريتكلوإندوثيليوسيس LTR من سرطانات ليمفاوية وأفخاخ الدجاج المصابة بفيروس ريتكلوإندوثيليوسيس، لكن ليس من دي إن إيه من الليكوسيس الليمفاوي أو أورام مرض مارك (1, 13, 19). يوضح اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل وجود أو غياب الفيروس المتعلق ولذلك له نفس المحددات لتشخيص الورم كما في عزل الفيروس.

References

1. Aly, M. M., E. J. Smith, and A. M. Fady. Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 22:543-554. 1993.
2. Aly, M. M., R. L. Witter, and A. M. Fady. Enhancement of reticuloendotheliosis virus-induced bursal lymphomas by serotype 2 Marek's disease virus. *Avian Pathol.* 25:81-94. 1996.
3. Bacon, L. D., R. L. Witter, and A. M. Fady. Augmentation of oncomavirus-induced lymphoid leukosis by Marek's disease herpesviruses in white leghorn chickens. *J. Virol.* 63:504-512. 1989.
4. Biggs, P. M. Lymphoproliferative disease of turkeys. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 485-488. 1997.
5. Calnek, B. W., and R. L. Witter. Marek's disease. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 369-413. 1997.
6. Calvert, J. G., and K. Nazerian. An immunoperoxidase plaque assay for reticuloendotheliosis virus and its application to a sensitive serum neutralization assay. *Avian Dis.* 38:165-171. 1994.
7. Chen, P. Y., Z. Cut, L. F. Lee, and R. L. Witter. Serologic differences among non-defective reticuloendotheliosis viruses. *Arch. Virol.* 93:233-245. 1987.
8. Cho, B. R. Cytopathic effects and focus formation by reticuloendotheliosis viruses in a quail fibroblast cell line. *Avian Dis.* 27:261-270. 1983.

9. Crittenden, L. B., S. McMahon, M. S. Halpem, and A. M. Fadly. Embryonic infection with the endogenous avian leukosis virus Rous-associated virus-0 alters response to exogenous avian leukosis virus infection. *J. Virol.* 61:722-725. 1987.
10. Crittenden, L. B., and E. J. Smith. A comparison of test materials for differentiating avian leukosis virus group-specific antigens of endogenous and exogenous origin. *Avian Dis.* 28:1057-1070. 1984.
11. Cut, Z., L. F. Lee, R. F. Silva, and R. L. Witter. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: identification of strain specific and strain common epitopes. *J. Immunol.* 136:4237-4242. 1986.
12. Cut, Z., L. F. Lee, E. J. Smith, R. L. Witter, and T. S. Chang. Monoclonal-antibody-mediated enzyme-linked immunosorbent assay for detection of reticuloendotheliosis viruses. *Avian Dis.* 32:32-40. 1988.
13. Davidson, I., A. Borovskay, S. Peri, and M. Malkinson. 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.* 24:69-94. 1995.
14. DeBoer, G. F., and A.D.M.E. Osterhaus. Application of monoclonal antibodies in the avian leukosis virus gs-antigen ELISA. *Avian Pathol.* 14:39-55. 1985.
15. Ewert, D. L., and G. F. DeBoer. Avian lymphoid leukosis: mechanism of lymphoma genesis. In: *Immunodeficiency disorders*. K. Perk, ed. Academic Press, Boston, Mass., pp. 37-53. 1988.
16. Fadly, A. M., T. F. Davison, L. N. Payne, and K. Howe. Avian leukosis virus infection and shedding in brown leghorn chickens treated with corticosterone or exposed to various stressors. *Avian Pathol.* 18:283-298. 1989.
17. Fadly, A. M., W. Okazaki, E. J. Smith, and L. B. Crittenden. Relative efficiency of test procedures to detect lymphoid leukosis virus infection. *Poult. Sci.* 60:2037-2044. 1981.
18. Fadly, A. M., and R. L. Witter. Effects of age at infection with serotype 2 Marek's disease virus on enhancement of avian leukosis virus-induced lymphomas. *Avian Pathol.* 22:565-576. 1995.
19. Fadly, A. M., R. L. Witter, E. J. Smith, R. F. Silva, W. M. Reed, F. J. Hoerr, and M. R. Putnam. An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.* 25:35-47. 1996.
20. Glika, F., and J. L. Spencer. Immunohistochemical identification of group specific antigen in avian leukosis virus infected chickens. *Can. J. Comp. Med.* 48:322-326. 1984.
21. Hoelzer, J. D., R. B. Franklin, and H. R. Bose. Transformation by reticuloendotheliosis virus: development of a focus assay and isolation of a non-transforming virus. *Virology* 93:20-30. 1979.
22. Ianculescu, M. Reticuloendotheliosis antigen for the agar gel precipitation test. *Avian Pathol.* 6:259-267. 1977.
23. Johnson, D. A., J. W. Guatsch, J. R. Sportsman, and J. H. Eder. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* 1:3-8. 1984.
24. Neumann, U., and R. L. Witter. Differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease by tumor-associated criteria. I. Studies on experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 23:417-425. 1979.
25. Okazaki, W., H. G. Purchase, and B. R. Burmester. Phenotypic mixing test to detect and assay avian leukosis viruses. *Avian Dis.* 19:311-317. 1975.
26. Payne, L. N., S. R. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J. A. Frazier, and M. E. Thouless. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.* 72:801-807. 1991.
27. Payne, L. N., and A. M. Fadly. Leukosis/sarcoma group. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 414-466. 1997.
28. Payne, L. N., A. M. Gillespie, and K. Howes. Unsuitability of chicken sera for detection of exogenous ALV by the group-specific antigen ELISA. *Vet. Rec.* 132:555-557. 1993.
29. Purchase, H. G., C. G. Ludford, K. Nazerian, and H. W. Cox. A new group of oncogenic viruses: reticuloendotheliosis, chick syncytial, duck infectious anemia, and spleen necrosis viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:489-499. 1973.
30. Reimann, I., and O. Werner. Use of polymerase chain reaction for the detection of reticuloendotheliosis virus in Marek's disease vaccines and chicken tissues. *J. Vet. Med.* 43:75-84. 1996.
31. Rodriguez, F. R., and F. Deinhardt. Preparation of a semi-permanent mounting medium for fluorescent antibody studies. *Virology* 12:316-317. 1960.
32. Rispens, B. H., P. A. Long, W. Okazaki, and B. R. Burmester. The NP activation test for assay of avian leukosis/sarcoma viruses. *Avian Dis.* 14:738-751. 1970.

33. Rubin, H. A virus in chick embryos which induces resistance in vitro to infection with Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46:1105-1119. 1960.
34. Sarma, P. S., D. K. Jain, H. K. Mishra, J. L. Vernon, P. S. Paul, and B. S. Pomeroy. Isolation and characterization of viruses from natural outbreaks of reticuloendotheliosis in turkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* 54:1355-1359. 1975.
35. Sarma, P. S., H. C. Turner, and R. J. Huebner. An avian leukosis group-specific complement-fixation reaction. Application for the detection and assay of non-cytopathogenic leukosis viruses. *Virology* 23:313-321. 1964.
36. Siccardi, F. J., and B. R. Burmester. The differential diagnosis of lymphoid leukosis and Marek's disease. *USDA Technical Bulletin* 1412. 1970.
37. Smith, E. J., A. M. Fadly, and L. B. Crittenden. Observations on an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against avian leukosis-sarcoma viruses. *Avian Dis.* 30:488-493. 1986.
38. Smith, E. J., J. J. Solomon, and R. L. Witter. Complement-fixation test for reticuloendotheliosis viruses: limits of sensitivity in infected avian cells. *Avian Dis.* 21:612-622. 1977.
39. Smith, E. J., and R. L. Witter. Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 27:225-234. 1983.
40. Spencer, J. L., L. B. Crittenden, B. R. Burmester, C. Romero, and R. L. Witter. Lymphoid leukosis viruses, and gs antigen in unincubated chicken eggs. *Avian Pathol.* 5:221-226. 1976.
41. Takagi, M., I. Kiyoyasu, N. Hideki, T. Sasaki, G. Kisako, and H. Koyama. Detection of contamination of vaccines with the reticuloendotheliosis virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Virus Res.* 40:113-121. 1996.
42. Temin, H. M., and V. K. Kassner. Replication of reticuloendotheliosis viruses in cell cultures: acute infection. *J. Virol.* 13:291-297. 1974.
43. Theilen, G. H., R. F. Zeigel, and M. J. Twiehaus. Biological studies with RE virus (strain T) that induces reticuloendotheliosis in turkeys, chickens, and Japanese quail. *J. Natl. Cancer Inst.* 37:731-743. 1966.
44. U.S. Department of Agriculture, SAM-405. Supplemental assay method for detecting lymphoid leukosis biocontamination by the COFAL test. *Biologics Laboratories, Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, Ames, Iowa.* 1973.
45. Van Woensel, P. A. M., A. van Blaaderen, R. J. M. Mooman, and G. F. de Boer. Detection of proviral DNA and viral RNA in various tissues early after avian leukosis virus infection. *Leukemia* 6(Suppl. 3):1355-1375. 1992.
46. Witter, R.L. Reticuloendotheliosis. In: *Diseases of Poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. Mc Dougald and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 467-484. 1997.
47. Witter, R. L., and D. W. Salter. Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in breeder turkeys. *Avian Dis.* 33:226-235. 1989.
48. Wright, S. E., and D. D. Bennett. Avian oncomavirus recombinant expressing foreign envelope delays tumour formation of ASV-A-induced sarcoma. *Vaccine* 10:375-378. 1992.