

J 亚群禽白血病毒中国分离株的人工致病性试验

杜 岩¹, 崔治中^{1,2}

(¹ 山东省畜禽疫病防治技术工程研究中心,泰安 271018; ² 山东农业大学动物科技学院,泰安 271018)

摘要:通过接种 1 日龄 AA 肉用型鸡和 11 日龄 SPF 鸡胚(蛋用型鸡)对 4 个 J 亚群禽白血病毒(ALV-J)中国分离株的致病性进行了研究。在连续观察的 6 个月中,只有从病鸡分离到的 SD9902 株 ALV-J 可诱发急性髓细胞瘤(ML)。在 SD9902 株病毒人工接种的 12 只 1 日龄的 AA 肉用型鸡中,有 9 只分别在 22~38 日龄死亡,其肝、脾显著增生性肿大,并显现弥散性分布的细小的灰白色结节,心肌上可见许多大小不一的肿瘤结节。病理组织切片中,在肝脏、心肌和骨骼肌等组织中均可见胞浆中大量充满嗜酸性颗粒的髓细胞样肿瘤细胞。其余 3 株病毒感染的肉用型鸡无肉眼可见的肿瘤性变化,生长和临床表现正常。显然,SD9902 株 ALV-J 为急性转化型病毒,而 SD9901、YZ9901 和 YZ9902 这 3 株病毒仍属致病性较弱的非转化型病毒。11 日龄的 SPF 鸡胚(蛋用型鸡)在接种这 4 株病毒后孵出的鸡,在近 7 个月的连续观察中,没有发现肿瘤性变化,其生长和临床表现基本正常,表明这 4 株中国株 ALV-J 对蛋用型鸡不表现致癌性。

关键词: J 亚群禽白血病毒; 致病性; 髓细胞瘤

Study on Pathogenicity of Chinese Strains of Subgroup J Avian Leukosis Viruses

DU Yan¹, CUI Zhi-zhong^{1,2}

(¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018;

² Animal Disease Prevention Technology and Research Center of Shandong Province, Taian 271018)

Abstract: The pathogenicity of 4 Chinese isolated strains of subgroup J Avian leukosis viruses (ALV-J), SD9901, SD9902, YZ9901 and YZ9902, was studied. The results showed that in these 4 Chinese strains, only SD9902 strain induced death with Myeloid Leukosis (ML) and among 12 AA meat-type chickens inoculated with SD9902, 9 chickens died between 22 days and 38 days respectively, after inoculation at 1-day-old. Chickens inoculated with the other 3 strains during the period of 6 months did not die. These results suggested SD9902 strain of ALV-J was an acutely transforming virus, but SD9901, YZ9901 and YZ9902 strains were non-transforming viruses. All 4 Chinese isolated strains did not induce tumors in SPF chickens (egg-type) during 7 months even viruses were injected into 11-day-old embryos.

Key words: ALV-J; Pathogenicity; Myeloid leukosis

20 世纪 80 年代末期发现的 J 亚群禽白血病毒(ALV-J),给全世界的养禽业带来了巨大的冲击,它主要引起肉用型鸡发生髓细胞瘤(ML)和其它多种恶性肿瘤,主要是 25~55 周龄的鸡,在死亡高峰时致死率每月可达 6%^[1,2]。

近年来,ALV-J 已从非转化型致癌性病毒演变

出急性转化型的致癌性病毒。如最早发现的 ALV-J 的原型株 HPRS-103,经孵化 11 日龄鸡胚接种,肉用型鸡在出壳后最快也要在 64~78 日才开始出现髓细胞瘤或肾瘤造成的死亡,平均经 142~143 d^[3]。然而,近几年从实验性和临床的 ALV-J 病例中分离到一些急性转化型毒株,可使培养的骨髓细胞发生

收稿日期:2000-10-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30040011)

作者简介:杜 岩(1975-),男,江苏宿迁人,博士研究生,主要从事动物分子生物学研究。崔治中为本文通讯作者,Tel: 0538-8241560; Fax: 0538-8241419; E-mail: zccui@sdau.edu.cn

迅速转化,在肉用型鸡感染时可表现出更快的致瘤性,最快可在 5 周龄诱发 ML 而引起死亡,其平均死亡周龄为 9 周龄,且表现出很高的传染性和发病率^[2,4,5]。显然,在 ALV-J 发现后的近 10 年内,其致病性发生了重大的演化。

不久前,我们曾报道了 ALV-J 在我国鸡群中的存在^[6]。在本研究中我们通过人工接种 1 日龄 AA 肉鸡和 11 日龄的 SPF 鸡胚(蛋用型鸡),对这 4 株中国分离毒的致病性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 病料和病毒

本研究中所用的 YZ9901、YZ9902 病料为从江苏省扬州市市场上商品肉鸡中采集的脾脏,而 SD9901 和 SD9902 病料为山东省某肉用型种鸡场的处于产蛋后期的 J 型白血病死亡的鸡的肿大的肝脏和脾脏^[7],均已经与 ALV-J 特异性单抗 JE9^[8]的间接免疫荧光反应(IFA)和 PCR 扩增其 *env* 基因片段并测序所证实。本研究中所用的 YZ9901、YZ9902、SD9901 和 SD9902 株病毒悬液为我们用原始病料分别接种 0 系 CEF 分离病毒后所获得的相应的细胞培养上清液^[7]。

1.2 试验动物及饲养

1 日龄 AA 肉鸡共 44 只,分 9 组分别腹腔接种不同的病料样品或灭菌的 PBS,分开饲养,饲料为大江公司全价料。此外,还按常规免疫程序进行了预防接种,即:1 日龄注射 MDV 苗,12 日龄新城疫 IV 系苗滴鼻、点眼,15 日龄法氏囊弱毒苗滴鼻、点眼,35 日龄新城疫油苗肌注。11 日龄 SPF 鸡胚(蛋用型鸡)共 54 枚,分 9 组,分别尿囊腔接种不同的病料样品或灭菌的 PBS,分开孵化,雏鸡出壳后也分开饲养,饲料为大江公司全价料。对其也进行了免疫接种,程序为:3 日龄新城疫 IV 系苗滴鼻、点眼,10 日龄法氏囊弱毒苗滴鼻、点眼,35 日龄新城疫油苗肌注。

1.3 试验设计

用 YZ9901、YZ9902、SD9901 和 SD9902 等 4 株病毒的原始病料和细胞培养上清,分别通过腹腔和尿囊腔接种,各接种 1 组 1 日龄 AA 肉用型鸡和 1 组 11 日龄的 SPF 鸡胚(蛋用型鸡)。肉用型鸡和 SPF 鸡胚孵出的鸡按上述方式饲养,发病死亡后,剖检记录肉眼病变,并采集死亡鸡的内脏及肿瘤组织,15%福尔马林溶液固定,做病理切片,进行病理组织学检查;同时采集死亡鸡的内脏组织,用接种细

胞法和间接免疫荧光反应进行病毒学检查。为了监测试验鸡体内肿瘤的发生、发展状态,定期剖杀部分试验肉鸡,观察肉眼病变,并按上述同样方法进行病理组织学及病毒学检查。

1.4 用接种细胞法检测 ALV-J

按我们已经报道的方法^[6]进行:待检测的病料样品(经研磨过滤的病料组织或无菌抗凝采集的血液样品)接种 0 系鸡胚成纤维细胞(CEF),并维持 7d 后,分别通过与 ALV-J 特异性单抗 JE9^[8]的间接免疫荧光(IFA)反应;并提取 CEF 的基因组 DNA,用 1 对 ALV-J 特异的 PCR 引物做 PCR,来检测 ALV-J 的感染。

1.5 肾脏触片的间接免疫荧光反应

试验肉鸡的肾脏组织触片,用冷丙酮-乙醇(6◇4)固定 5~10 min, PBS 洗涤 1 次,经空气干燥后即可通过 IFA 反应检测病毒感染。用特异性抗 ALV-J 单抗 JE9^[8](1◇500 稀释)作第一抗体,37℃作用 45 min, PBS 洗涤 3 遍后,再用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(Boehringer Mannheim Corp.)作为第二抗体 37℃作用 45 min,经 PBS 洗涤后,在 OLYMPUS IX-50 型荧光倒置显微镜下观察,记录结果。凡有特异的亮绿色荧光者,判为阳性,反之判为阴性。用未攻毒的对照组试验鸡的内脏触片作为阴性对照。

1.6 病理组织切片的制备

病理组织石蜡切片的制备按常规方法进行,简述如下:取试验肉鸡的内脏组织或疑似有病变的组织用锋利的刀片切成 0.3~0.4cm 厚的薄片,放入 15%的福尔马林溶液中固定 12h 以上,用乙醇梯度脱水后透明组织,石蜡液透蜡、包埋,切片,染色。最后,显微镜观察、拍照、记录。

2 结果与分析

2.1 肉用型鸡发病死亡后的剖检变化、病理石蜡切片及病毒学检查结果

试验肉鸡于 1 日龄接种样品后,只有 SD9902 株 ALV-J 接种的两组共 12 只鸡中的 9 只于 22~38 日龄发病死亡,其中接种 SD9902 株病毒病料样品的 6 只鸡全部发病死亡,其死亡日龄分别为 22、30、32、35、35、36;接种 SD9902 细胞培养上清的 6 只鸡中有 3 只发病死亡,其死亡日龄分别为 31、36、38;其平均死亡日龄为 33 日龄。所有发病死亡的试验肉鸡剖检后的肉眼病变基本相似,主要可见肝脏肿大(9/9),脾脏肿大(5/9),心脏上可见明显的肿瘤结

节(9/9),肾脏肿大(3/9)(图版-1);在病理组织学检查中可见在肝脏、脾脏、肾脏、心肌和骨骼肌中有大量增生的髓细胞样肿瘤细胞,在一些典型的髓细胞胞浆中可见许多嗜酸性颗粒,在心肌纤维间可见大量增生的髓细胞,心肌纤维被挤压或取代(图版-2);在骨骼肌组织中可见肌纤维间增生的髓细胞,髓细胞的主要特征为胞浆内挤满大量的嗜酸性颗粒,胞核较大呈空泡状,核仁明显(图版-3);肝组织间可见大量增生的髓细胞,肝脏组织被挤压或取代,髓细胞的胞浆内挤满大量的嗜酸性颗粒,胞核较大呈空泡状,核仁明显(图版-4,5)。发病鸡的肾脏组织触片,经冷丙酮◇乙醇(6◇4)固定后,在用 ALV-J 特异性的单克隆抗体 JE9^[8]作为一抗的 IFA 中,均可观察到特异的亮绿色的荧光,而相应的对照组鸡的肾脏触片不与 JE9 单抗发生反应;同时,所有来自发病死亡试验鸡的内脏组织,经研磨过滤接种 0 系 CEF 并维持 7d 后,用 IFA 和 PCR 也均可以检测到 ALV-J 的感染。

2.2 肉用型鸡人工攻毒后定期剖杀的剖检变化、病理切片及病毒学检查结果

为了定期观察肿瘤的发生发展情况,在 60、80、120、126 和 180 日龄从各组随机选取部分试验肉鸡剖杀,并进行病理组织学和病毒学两方面检查。结果表明,分别于 60 和 80 日龄剖杀的 SD9902 株病毒细胞培养上清接种的 6 只鸡中只有 2 只剖检肉眼变化可见肝、脾轻微肿大,其余肉鸡的剖检变化均基本正常。从这 2 只鸡的肝、脾、心肌和骨骼肌等的病理组织学切片中可观察到增生的髓细胞样肿瘤细胞。在病毒学检查中,上述 SD9902 株病毒接种的 2 只鸡在接种细胞法检测 ALV-J 及用 JE9 单抗对其肾脏触片进行的 IFA 中都显示为阳性。其余组肉鸡(包括对照组)的组织学检查均正常,但在病毒学检查中,接种 YZ9901、YZ9902 和 SD9901 株病毒的鸡,在接种细胞检测法(见 1.4)中,绝大多数的鸡(27/28)可以检测到 ALV-J 的感染,不过其肾脏触片却与 JE9 单抗不发生反应,这可能是由于试验鸡没有发病,因而其体内病毒复制量太小的缘故;未攻毒的对照组的鸡在两种病毒学检查方法中均为阴性。

2.3 SPF 鸡胚于 11 日龄感染病毒后所孵出的蛋用型鸡的发病及剖检情况

SPF 鸡胚于 11 日龄接种样品后所孵出的蛋用型鸡的生长发育状况正常,分别于 100、140、146 和 200 日龄剖杀了部分试验鸡,其剖检的肉眼变化均

未见异常,在病理组织学检查中也未见异常。对其进行的病毒学检查结果为:在接种细胞检测 ALV-J 法(见 1.4)中,所有被检测的试验鸡均为阳性,但利用其肾脏触片的 IFA,却不能检测到 ALV-J 的感染。

3 讨论

国外,对 ALV-J 的研究结果表明:肉用型鸡和蛋用型鸡对 ALV-J 都易感染,但在自然的状态下,ALV-J 主要引起肉用型鸡的髓细胞瘤(ML)^[1~3],通常是 25~55 周龄的鸡。本研究中我们分别通过人工接种 1 日龄 AA 肉鸡和 11 日龄 SPF 鸡胚(蛋用型鸡)两种方法,对中国株 ALV-J 病毒 SD9901、SD9902、YZ9901 和 YZ9902 的致病性进行了研究,结果仅 SD9902 株病毒可引起人工接种的 AA 肉鸡产生典型的髓细胞瘤。

在 20 世纪 90 年代初英国对 ALV-J 原型株 HPRS-103 致病性的研究中发现,若在胚胎期人工感染病毒,则肉用型鸡孵出后最早可在 9 周龄发生 ML,平均死亡周龄为 20 周,因而,可以认为 HPRS-103 是迟发型致瘤病毒^[2,3]。1995 年, Bai 等发表的 HPRS-103 的基因组全序列中也显示出 HPRS-103 的前病毒基因组中不含有病毒癌基因^[9]。但 1993 年, Payne 等从用 HPRS-103 人工感染引发的 ML 病例中,分离出 17 株病毒,其中 10 株病毒可使培养的骨髓细胞发生急性转化,最快仅需 14d^[5]。另外,近年来在临床 ML 病例中也分离出急性转化型的 ALV-J^[2,4]。

这一特性被认为是由于病毒从感染细胞中获得原癌基因的结果。急性转化型的 ALV-J 病毒显示出比 HPRS-103 更快的致瘤作用,最快可在 5 周龄产生 ML,平均死亡周龄为 9 周^[2]。本研究中肉用型鸡在 1 日龄感染这 4 株病毒后,直至 6 月龄全部剖杀时为止,只有 SD9902 株病毒的病料和细胞培养上清分别接种的 2 组试验肉鸡(共 12 只)中的 9 只在 22 日龄至 38 日龄发生 ML 而死亡(另外,该组分别于 60 和 80 日龄剖杀的 2 只试验肉鸡也通过病理组织学检查确认为 ML)。SD9902 株病毒接种 AA 肉鸡后可在如此早的日龄(最快可在 22 日龄,平均为 33 日龄)引起 ML,显然 SD9902 已成为一个急性转化型致瘤性毒株。但其它 3 株病毒接种的肉用型鸡,在连续观察的 6 个月内其生长情况正常,剖检鸡的肉眼变化也未见异常,显然,这 3 株病毒仍为致病性很弱的非转化型病毒,其致瘤作用可能要到

6 月龄后方能表现出来,在本研究中到 6 月龄后我们没有继续对其观察下去。

国外对 ALV-J 原型株的流行病学和致病性的研究表明,虽然 ALV-J 能够感染蛋用型鸡,但对其并不表现出致瘤性。在本研究中,我们在研究这 4 株中国株病毒对蛋用型鸡的致病性时,采用了胚胎接种的方法,以试图增强病毒对蛋用型鸡所表现出的致病性。试验蛋用型鸡自出壳后,其生长发育情况基本正常,在直至 200 日龄的多次剖杀中也未观察到肿瘤的发生。显然,这 4 株病毒对蛋用型鸡不表现出致瘤性。这与国外报道的结果一致。

致谢:本研究承蒙扬州大学畜牧兽医学院病理教研室朱坤熹教授、许益民教授、陈义平老师、吴力力老师和江苏省家禽研究所张志良、黄晋芳研究员的大力相助。

References :

- [1] Payne L N, et al. Leukosis/ Sarcoma group. Diseases of Poultry. Ames. USA :Iowa State University Press, 1997:414 - 466 .
- [2] Payne L N. HPRS-103 : a retrovirus strikes back . The emergence of subgroup J avian leukosis virus . Avian Pathology , 1998 , 27 :36 - 45 .
- [3] Payne L N, et al. Myeloid leukae mogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus . Leuke mia , 1992 , 6 : 1167 - 1176 .
- [4] Arshad S S, et al. Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivation acutely transforming virus . Veterinary Pathology , 1997 ,34 :127 - 137 .
- [5] Payne L N, et al. Recovery of acutely transforming viruses from myloid leucosis induced by HPRS - 103 strain of avian leukosis virus . Avian diseases , 37 :438 - 450 .
- [6] Du Y, et al. Subgroup J of Avian Leukosis Viruses in China . China Poultry Science , 1999 , 3(1) :1 - 4 .(in Chinese)
杜 岩,等. 从市场商品肉鸡中检出 J 亚群禽白血病病毒. 中国家禽学报,1999,3(1) :1 - 4 .
- [7] Du Y. Isolation of Chinese strains of subgroup J avian leukosis viruses, partial sequence comparison, pathogenicity study and env-gp85 gene expression. Master Thesis, Yangzhou University, 2000 .(in Chinese)
杜 岩. J 亚群禽白血病病毒中国株的分离、分子鉴定和致病性研究及其囊膜糖蛋白 gp85 基因的表达,硕士学位论文,扬州大学,2000 .
- [8] Qin A J. Biological and biochemical characterization of envelope gene of subgroup J avian leukosis virus . Ph. D Thesis , Yangzhou University , 1999 .(in Chinese)
秦爱建, J 亚群鸡白血病病毒囊膜蛋白 gp85 基因及其产物的生物学和生物化学特性的鉴定,博士学位论文,扬州大学,1999 .
- [9] Bai J, et al. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J) . Journal of General Virology , 1995 , 76 :181 - 187 .

欢迎订阅《农业图书情报学刊》

《农业图书情报学刊》于 1989 年创刊,是中国科协主管,中国农业科学院科技文献信息中心、中国农学会主办,中国农学会科技情报分会与农业图书馆分会承办的学术性、技术性、实用性专业期刊。办刊宗旨是宣传党和政府的有关图书情报政策,探讨农业图书情报领域的新理论、新技术、新方法,报道国内外农业图书情报业的发展趋势,交流工作经验,传播最新信息,提高人员素质,促进我国农业图书情报事业的发展。

本刊贯彻理论与实践相结合、普及与提高并重的办刊方针,辟有“情报研究”、“科学管理”、“信息化”、“信息技术”、“信息资源”、“信息服务”、“理论研究”、“文献计量学”、“信息教育”、“世界之窗”、“期刊编辑”、“档案管理”、“书刊评介”等栏目。自创刊以来,已形成了自己的特色,深受全国农业系统图书、情报、编辑、资料、档案工作者及有关院校师生及科研人员的欢迎。

双月刊,16 开本,80 页。国内外公开发行。国内统一刊号:CN11-2711/G2;国际标准刊号:ISSN1002-1248;每期定价 10 元,全年定价 60 元。

地址 北京中关村南大街 12 号

邮编 100081

电话 (010)68919879