

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫期中成果報告

NSC Project Reports

家禽白血病 J 亞群病毒基因、抗原性及病原性之演變 (1/3)

計畫編號：NSC 90-2313-B-002-309 (1/3)

執行期限：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

主持人：王金和 執行機構及單位名稱：國立台灣大學

共同主持人：無 執行機構及單位名稱：無

計畫參與人員：陳素貞 執行機構及單位名稱：國立台灣大學

一、中文摘要

家禽白血病 J 亞群病毒 (avian leukosis virus J subgroup [ALV-J]) 因在肉雞間的水平傳播快速及會造成生長遲緩而逐受重視。台灣的種雞大部分都是由國外進口的，在國外 ALV-J 已逐受控制的同時，在台灣的感染情形有多嚴重是我們所想要知道的。此外不同的雞種對 ALV-J 的抗性亦不同，而台灣的土雞的感染情形並未有任何的報告，因此我們研究目的是了解 ALV-J 在台灣土雞及白肉雞的分布情形。因現行常用的 ELISA 檢測方法會有內源性病毒的偽陽性出現，故我們決定採病毒分離 RT-PCR 進行檢測。在調查 8 場的白肉雞場，有 5 個場呈現 ALV-J 陽性 (62.5%)。在台灣土雞方面，我們總共調查 4 場的土雞及 1 場的土種雞。其中只有黑羽土種雞在經病毒分離及病理學檢查後證實確有感染 ALV-J 的情形，且其抗體陽性率呈現極低 (1.25%)，顯示其對 ALV-J 並無抗性，而在其他的土雞其抗體陽性率為 0-15%。之後我們將分離到的病毒包括土雞分離到的 4 株、種雞分離到的 12 株再加上由肉雞分離到的 5 株病毒經定序後與國外毒株比較，發現毒株間的相似度達 94-100%。而且在同一雞場，越晚分離到的毒株其相似度與之前分離到的差異越大，顯示病毒的序列持續在改變。在國

外經過幾年的撲滅計劃 ALV-J 已逐受控制，而經我們的研究發現台灣尚須更嚴謹的檢測及撲滅計劃來控制 ALV-J 的感染。

關鍵詞：家禽白血病、env 基因、演變
Abstract

The rapid spread of subgroup J avian leucosis virus (ALV-J) and stunting effect on chickens are noticed by the poultry industry. Most breeders are imported. Since most breeding companies has claimed that they have control ALV-J infection in chickens, we would like to know the infection status of the imported chickens as well as their offspring in the field. The purpose of the present study is to investigate the situation of ALV-J infection in Taiwan broiler and native chickens. Since ELISA fails to distinguish exogenous and endogenous ALV, virus isolation was used in this study. The contamination rate of broilers was 62.5%. One native breeder farms showed signs and lesions of ALV-J infection, while no virus was isolated from native meat-type chickens with %15 anti-ALV-J antibody. The phylogenetic analysis of the ALV-J isolates from breeders, broiler, native chickens were compared with reference strains. The results show that ALV-J is changing during this investigation, and more attention should be paid to the control of ALV-J in Taiwan.
Keywords: Avian leucosis virus, env gene, evolution

二、緣由與目的

家禽白血病 J 亞型 (Avian leucosis

virus-J, ALV-J) 較以往的 ALV 有較廣的宿主範圍性,除了家禽類的雞外,尚有雉雞及火雞對其有感受性 (Payne, 1992b)。ALV-J 如同其他的外源性病毒會藉水平及垂直感染其他雞隻。受感染的雞隻依照雞的種別不同及受感染的日齡不同,其結果亦有所不同 (Payne, 1992b)。而在所有的雞種中肉雞對 ALV-J 感受性最高,使其易成為排毒者 (shedders) 及產生腫瘤。除此之外,肉雞在雞隻間的水平傳播亦最快速 (Fadly et al., 1999),而更增加了控制的困難。台灣的養雞業與國外關係密切,自 1995 年由王等人證實台灣亦有 ALV-J 感染的情形後 (Wang, 1995),一直亦有病例的發生。而本實驗室亦已證實台灣的肉種雞場有感染 ALV-J (Hwang, 2001) 的情形。家禽白血病的控制以撲滅計劃、飼養管理及培育對白血病有抗性的雞種為主 (Payne, 1998)。有些雞種 (Leghorn strains) 對 ALV-J 較有抗性 (Payne, 1992b),但台灣土雞的感染情形並未見於報告。此外在國外經過幾年的撲滅計劃後,ALV-J 已逐漸受到控制 (Payne, 1998)。而台灣的原始種雞場大部分都是由國外來的。在國外 ALV-J 已受控制的同時,在台灣 ALV-J 感染情形到底有多嚴重亦是我們所想要知道的。因此我們的研究目的是了解 ALV-J 在台灣土雞及白肉雞等雞種的分布情形。

材料與方法

1.1 血漿樣本之採樣:血漿樣本的來源有 2,分別為:屠宰場與雞場來源。

病毒分離與細胞培: DF 1 細胞株 (CRL-12203) 為來自美國 ATCC (ATCC CRL-12203; American Type Culture Collection, Manassas, VA) 所購置得來的,是一種具有抗家禽白血病內源性病毒 (subgroup E) 感染特性的雞胚胎纖維芽母細胞株 (chicken embryo fibroblast cell line)。

細胞的繼代: 將已形成單一層細胞的 25 cm² 細胞培養瓶 (Corning, Acton, MA) 以 5mL 之 PBS (GIBCO BRL, California) 溶液清洗 3 次,再加入 0.05%

Trypsin-Versene (Life Technologies, Grand Island, NY) 蓋滿細胞層。放入 37 °C 5% CO₂ 培養箱感作 1 分鐘,待細胞均呈圓形化後取出並倒掉上清液,隨即加入 1mL 之含有 10% 胎牛血清 (Hyclone, Logan, Utah) 及廣效性抗生素 (Life Technologies, Grand Island, NY) 之 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, pH 7.0-7.2) (Life Technologies, Grand Island, NY) 培養液,以 pipetmen 吸放數次後,取 25 μ L 細胞液與 100 μ L trypan blue (Sigma, St Louis, Mo) 混合後,用血球計數盤計算出未被染色之活細胞數,然後加入適當的 DMEM 培養液將細胞數稀釋成每 mL 10⁷ 個,之後分裝至 25 cm² 細胞培養瓶或 24 孔細胞培養盤 (Nunc, Roskilde, Denmark) 中。

病毒之分離: 以製備好之臟器乳劑或經離心去除紅血球的血漿進行病毒的分離。在乳劑方面,將乳劑加入 PBS (GIBCO BRL, California) 稀釋 10 倍,取 200mL,加入經隔夜培養並倒掉培養液之 25 cm² 細胞培養瓶 (Corning, Acton, MA) 中,感作 1 小時。之後隨即加入新鮮並經回溫的培養液,放入 39°C、5% CO₂ 的培養箱中培養隔夜,隔夜後即換掉培養液。

病毒核酸之增殖: 略 0.1 μ L,濃度為 200 U/ μ LMoloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) reverse transcriptase (RevertAidTM M-MuLV reverse transcriptase) (Life Technologies, Frederick, MD),使體積為 20 μ L。置於 TS-960 Thermal sequencer (Corbett Research, Australia) 中進行反應。反應條件設定為 42°C,90 分鐘,然後再以 70 °C,15 分鐘終止反轉錄酶的作用。每管取 2mL 以進行聚合酶鏈反應 (PCR) 的反應。

結果

臨床病例之病毒序列分析: 我們將由臨床所分離到的 11 病毒經正反双向定序,而且每一株病毒至少均經過 2 次以上的正反双向定序後確定其病毒序列。將

這 11 株病毒序列以序列分析軟體 DNASAR (DNASTAR Inc, Madison, WI) 中的 MegAlain 進行序列的比對，再以 MEGA (version 2.1, Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 軟體繪出親源樹狀圖。我們可發現包括英國毒株 HPRS-103 在內的 11 株由臨床分離到的病毒約可分成 2 群。而因 2920 定序有問題，故暫不列入。2909、2914 與 2918、2919 是屬於親源性較近的一群，而英國毒株 HPRS-103、2911、2921、2933、2952、2990 則為親源性較近的一群。而如我們以雞場的來源公司作分類的話，可發現同是屬於第 2 家公司的幾株病毒，即除了 2990 之外的其它毒株，均平均分布在這 2 群中，因此由該家公司來的毒株有分成 2 群的趨勢。

肉雞分離之病毒序列分析：在完成臨床病例的親源性樹狀圖後，我們再將由進行肉雞場調查時所分離到的 5 株病毒一起進行病毒的序列分析，請參照 Figure 11。而第 6 場肉雞場的毒株 m 605 因定序時發生問題，故暫不列入。由親源性樹狀圖可發現這 5 株由肉雞場所分離到的病毒 (m 212、m 512、m 724、m 813、m 924)，其親源性關係均被歸於由臨床所分離到的 2 群毒株中的其中 1 群。另外在上下游的雞場的關係方面，2990 為一 GP 場，其下游的肉種雞場為 m924，因此這 2 株病毒其親源性很接近。在其它的肉雞場方面我們亦追溯過其上游的種雞來源，而因我們錯過在肉雞送至屠宰場時較佳的追問時機，因此在事後我們只能確定的是那些有固定向同一肉種雞場訂購的肉雞場。有較固定來源的為第 2、5 及第 6 場。第 2 及第 5 為同一雞場，這 3 場的上游來源均為第 1 公司的種雞來源，而第 7 場肉雞場則表示第 1 間公司為其來源種雞場之一，但無固定的上游雞場來源。而第 8 場肉雞場我們則無更詳盡的資料，故不清楚其上游種雞場來源。

土雞分離之病毒序列分析：我們將由土雞場 ALV-J 盛行率調查時由土雞場第 1、2 場 N1、N2 所分離到的 3 株病毒 n 119、n 201、n 207 定序其 gp85 基因片段，再將之與由同一土雞場來源但為由 ML 腫瘤所分

離到的 2991 進行比對，其結果請參照 Figure 12。由 Figure 12 可見，屬於同一批的 n 201、n 207 其親源性較接近，彼此間的相似度為 95.9%。而與 n 119 屬於同一批雞但為腫瘤所分離到的 2991，其彼此的親源性相差較近，相似度有 99.6%，因此親源性樹狀圖的結果有依照 2 批的土雞而分成 2 群的現象。

土雞病毒序列與其它毒株之關係：台灣土雞場的來源很複雜，又依地區的不同而有所不同 (李)。因此為了解土雞場所分離到的 ALV-J 病毒其來源為何，我們將這 4 株病毒與其它分離到的病毒作親源性樹狀圖的比對，請參照 Figure 13。由 Figure 13 可見台灣所分離到的毒株可分成 2 群，而這 4 株由土雞場所分離到的病毒 n119、2991、n201、n207 亦分布於這 2 群之中。其中親源性較接近的 n 119、2991 成一群，而 n 201、n 207 則屬另一群。

討論

完成台灣分離株之親緣樹狀圖，了解本國發生及流行情形及國內毒株的來源，國內毒株的 env 序列抗原性是否如英美的毒株一樣迅速變異，再與種雞來源比較，建立本病之流行病學資料；於參加 ALV-J 國際研討會時，與會的專家學者一致認為此部分的工作若能完成有助本病於世界各地流行病學的資料的完整，具有高度的學術價值。在國內方面，了解本病的流行情形有助本病的控制。參與之研究生可訓練實驗設計進行、分生實驗技術操作、基因分析軟之應用及成果。

五、參考文獻

Payne LN, Brown SR, Bumstead N, Howes K, Frazier JA, Thouless ME. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. J Gen Virol 72: 801-807, 1991. Payne LN, Howes K, Gillette AM, Smith LM. Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelop subgroup, designated J. J Gen Virol 73: 2995-2997, 1992.

[1]

附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期中報告

[illegible]

計畫類別： ☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2321-B-002-309-

執行期間：90 年 08 月 01 日至 91 年 07 月 31 日

計畫主持人：王金和 Chingho@ccms.ntu.edu.tw

共同主持人：無

計畫參與人員：陳素貞 Su5115@yahoo.com.tw

本成果報告包括以下應繳交之附件：無

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學獸醫學系

中 華 民 國 91 年 05 月 15 日