



棉铃虫核型多角体病毒对脊椎动物的 毒性及致病性试验

袁 观 修 朱 必 春

(中国科学院武汉病毒研究所, 武昌)

徐 国 景 易 明 定

(湖北省卫生防疫站, 武昌)

随着核型多角体病毒用于害虫的防治, 昆虫病毒对人畜安全性问题日益受到各国的重视。最早进行这方面研究工作的是美国学者^[1]。继他们之后, 美国及其它国家学者已用 51 种病毒对 20 种脊椎动物进行系统的毒性试验, 证明许多昆虫病毒无致病性^[2,3]。为了对安全生产和使用病毒杀虫剂提供依据, 我们对棉铃虫核型多角体病毒和 79-4B 型棉铃虫核型多角体病毒制剂进行了一系列安全性试验。现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 毒株和制剂: Sol-43 毒株由本所分离, 棉铃虫病毒液和病毒制剂 79-4B 由蒋湖农场提供, (5 亿 PIB/克)。病毒液用纱布过滤, 差速离心提纯, 浓缩成含核型多角体病毒为 8—120 亿 PIB/ml 的悬液, 加入双抗抑制杂菌繁殖, 放入冰箱保存备用, 见图版 1-1。

2. 病毒粒子的制备: 将核型多角体病毒悬液 (5mg/ml), 悬浮于 0.008MNaCO₃ + 0.05M NaCl, pH 为 10.5 的溶液中, 在 0—4℃ 用磁力搅拌器搅拌、降解, 定时取样镜检其降解程度, 然后以 2500—3500rpm/min 速度离心。去沉淀, 取上清液电镜检查合格, 见图版 1-1。

3. 试验动物: 采用小白鼠、豚鼠、金地鼠、家兔、鸡、鸽、金鱼等 7 种成年动物, 雌雄兼有或各半, 部分由本所饲养场提供, 其余由湖北医学院、金水闸畜牧所等单位提供, 经一周饲养观

察, 外观健康。

4. 试验内容: 分急性、亚急性和慢性毒性试验。急性试验为灌胃、吸入、涂皮、粘膜接种、腹腔、静脉、肌肉、皮下注射一次或多次。吸入试验是将动物放入 0.18M³ 的染毒柜内, 用 JM-II 型医用喷雾器雾化核型多角体病毒液, 使动物自由吸入, 空气中核型多角体病毒浓度用抽气过滤法将核型多角体病毒阻留在洗涤液内, 计量。其他接种方法按常规操作进行。接种后观察三周。亚急性和慢性试验用核型多角体病毒拌食分别饲喂 90 天和 180 天。观察指标包括动物表现(为每天记录一次); 体温(第一周每天测量一次, 以后每三天测量一次); 体重(每三天称重一次); 血液中的红、白细胞计数(试验前后各一次)。上述观察结束后将动物解剖、肉眼检查, 取半数动物的心、肺、肝、脾、肾做石蜡切片和超薄切片用电镜检查。

试 验 结 果

一、急性毒性试验

7 种动物共经 8 种接种途径感染病毒液, 均无异常表现。体重增加(表 3), 体温、红细胞、白细胞计数正常(表 4)。但对对照组和实验组均有少数动物死亡(表 1)。

腹腔注射死亡主要是因为技术误差引起的。吸入组和腹腔注射组中个别试验动物有急性支气管炎、支气管肺炎、肝灶灶状坏死等病变。但出现数量、死亡分布情况与剂量无明显

表 1 棉铃虫核型多角体病毒 (NPV) 急性毒性试验

接种方式	处理	剂量亿 PIB/kg 体重	动物			检 查 结 果		
			种类	数量 (只)	死亡数只			
灌胃一次	多角体	21	家鸡	12	0	无	异	常
	对照		家鸡	12	0	无	异	常
	多角体	39.0	家鸽	10	0	无	异	常
	对照		家鸽	10	0	无	异	常
灌胃五次	多角体	0.125	小白鼠	15	0	无	异	常
	多角体	0.25	小白鼠	15	0	无	异	常
	多角体	0.5	小白鼠	15	0	无	异	常
	对照		小白鼠	15	1	死	于	第 九 天
	多角体	5	金地鼠	4	0	无	异	常
	对照		金地鼠	4	0	无	异	常
病毒液中 喂养三天	多角体	0.001	金鱼	10	0	无	异	常
	多角体	0.03	金鱼	10	0	无	异	常
	多角体	0.05	金鱼	10	0	无	异	常
	对照		金鱼	10	1	死	于	第 七 天
吸入二小 时 ⁽¹⁾	多角体	5.79	小白鼠	15	0	1 只急性支气管炎 1 只支气管肺炎, 余无异常		
	多角体	11.6	小白鼠	15	1	1 只在吸入感染过程中死亡, 2 只支气管肺炎, 1 只肝有点灶状坏死		
	对照		小白鼠	10	0	1 只急性支气管炎 1 只支气管肺炎 余无异常		
	多角体	5.79	豚鼠	5	0	无	异	常
	对照		豚鼠	5	0	无	异	常
腹腔注 射一次	多角体	200	小白鼠	20	3 ⁽²⁾	3 只于注射后 12—24h 死亡, 余无异常		
	病毒粒 子 ⁽³⁾	200	小白鼠	20	4 ⁽⁴⁾	3 只于注射后 12—24h 死亡, 1 只肝小叶周边空泡变性, 于第九天死亡		
	对照		小白鼠	20	3 ⁽²⁾	3 只注射后 12—24h 死亡, 余无异常		
腹腔注 射五次	多角体	0.125	小白鼠	5	0	无	异	常
	多角体	0.25	小白鼠	5	0	无	异	常
	多角体	0.5	小白鼠	5	0	无	异	常
	多角体	1	小白鼠	5	0	无	异	常
	对照		小白鼠	5	0	无	异	常
腹腔注 射七次	多角体	2.5	小白鼠	10	0	无	异	常
	多角体	5	小白鼠	10	1	1 只于注射后 4 天死亡, 余无异常		
	多角体	10	小白鼠	10	1	1 只于注射后 10 天死亡, 余无异常		
	对照		小白鼠	10	0	无	异	常
腹腔注 射七次	多角体	1.5	豚鼠	11	1	1 只于注射后 3 天死亡, 余无异常		
	病毒粒 子 ⁽²⁾	1.5	豚鼠	6	0	1 只有点灶状坏死, 余无病理变化		

接种方式	处理	剂量亿 PIB/ 体重 kg	动物			检 查 结 果		
			种类	数量 (只)	死亡数只			
	对照		豚鼠	11	0	无	异	常
静脉注射六次	多角体	0.521	家兔	6	0	无	异	常
	病毒粒子 ⁽³⁾	0.521	家兔	8	0	无	异	常
	对照		家兔	8	0	无	异	常
皮下注射五次	多角体	0.5	家兔	6	0	无	异	常
	病毒粒子 ⁽³⁾	0.5	家兔	6	0	无	异	常
	对照		家兔	6	0	无	异	常
涂抹 2.5时	多角体	0.5	豚鼠	11	1	涂皮后 10 天死亡,余无异常		
	对照		豚鼠	11	0	无	异	常
涂抹10次	多角体	0.5	家兔	5	0	无	异	常
	对照		家兔	5	0	无	异	常
粘膜接种 滴眼 2—7次	多角体	0.5—5	家兔	14	0	无	异	常

(1) 吸入剂量单位为空气中多角体浓度亿 PIB/M³ 涂皮,滴眼,喂养金鱼剂量为亿 PIB/ml 对照无菌水。

(2) 死亡动物均有肠穿孔,腹腔内有粪便为注射损伤所致。

(3) 病毒粒子按降解后浓缩成一定湿重后进行换算的。

表 2 棉铃虫核型多角体病毒亚急性慢性毒性试验

接种方式	处 理	每天剂量亿 /kg 体重	动 物			检 查 结 果		
			种 类	数量(只)	死亡数(只)			
拌 食 喂 饲 90 天	79—4B	0.5	家 兔	5	0	无	异	常
	制 剂 对 照		家 兔	5	0	无	异	常
拌 食 喂 饲 180 天	多角体	0.2	小白鼠	30	3	死于第 14, 30, 33 天余无异常 死于第 10, 20 天 1 只为误伤致死余无异常 死于第 17 天, 55 天余无异常		
	病毒粒子	0.2	小白鼠	30	2			
	对 照		小白鼠	25	3			

关系。

二、亚急性毒性试验

喂饲结束时,给予动物的核型多角体病毒积累量相当于大田使用浓度的 4500 倍,动物无异常表现,食欲正常,反应灵敏,体重增加,(见表 3)体温、红细胞、白细胞计数均在正常范围,组织病理镜检,未见病理改变(见表 2)。

三、慢性毒性试验

试验中对照组死亡 3 只,两个试验组各死亡 2 和 3 只,各组死亡率经统计处理无明显差异。其余动物在累积量相当于大田使用浓度 3600 倍情况下,表现食欲、体重、体温、血液化验均正常,解剖检查无异常,组织病理镜检,未见病理改变(见表 2、3、4)。超薄切片电镜观察,未发现有核型多角体病毒寄生。

表 3 试验动物体重增长

动物种类	感染途径	病毒状态	病毒剂量 亿 PIB/kg 体重	动物数量 (只)	体 重 变 化		
					开始(g)	结束(g)	增长量
家兔	亚急性性饲喂	79-4B 制剂	45×10^8	5	1523	2038	515
		对 照	—	5	1290	1990	700
	静脉注射	多角体	$0.5-1 \times 10^8$	8	2538.8	2772.5	233.7
		病毒粒子	$0.5-1 \times 10^8$	6	1856.3	2260	403.7
		蒸馏水	—	8	1945	2105	160
	粘 膜	多角体	$0.5-5 \times 10^8$	14	1332.5	1598	265.5
皮 肤		多角体 ⁽¹⁾	$0.5 \times 10^8/\text{ml}$	5	1205	1443	238
		蒸 馏 水	—	5	1293	1665	272
小白鼠	慢性饲喂	多角体	36×10^8	30	16.3	26.7	10.3
		病毒粒子	36×10^8	30	20.1	27.7	7.6
		蒸 馏 水	—	25	19.3	26.0	6.7
	腹腔注射	多角体	$2.5-200 \times 10^8$	70	24.8	6.8	6.8
		病毒粒子	$2.5-200 \times 10^8$	20	19.4	24.3	4.9
		蒸 馏 水	—	35	18.5	25.1	6.6
吸 入	多角体 ⁽²⁾	$11.6 \times 10^8/\text{M}^3$	15	22.6	23.7	1.1	
	病毒粒子	$5.79 \times 10^8/\text{M}^3$	15	22.5	23.8	1.3	
	蒸 馏 水	—	10	22.1	23.9	1.8	
灌 胃	多角体	0.125×10^8	50	18.5	23.3	4.8	
	蒸 馏 水	—	15	20.1	24.7	4.6	
豚鼠	吸 入	多角体	$5.79 \times 10^8/\text{M}^3$	5	453.1	497.1	45
		蒸 馏 水	—	5	471.9	498	26.1
	皮 肤	多角体 ⁽¹⁾	$0.5 \times 10^8/\text{ml}$	11	441	488.6	47.6
		蒸 馏 水	—	11	420	489.1	69.1
	腹腔注射	多角体	15×10^8	11	417	498.8	81.8
		病毒粒子	15×10^8	6	362.5	412.1	49.6
	蒸 馏 水	—	11	411.5	511.6	100.1	
家 鸡	饲 喂	多角体	21×10^8	12	4200	7600	3400
		蒸 馏 水	—	12	4250	7625	3375
家 鸽	饲 喂	多角体	39.6×10^8	10	2885	3120	235
		蒸 馏 水	—	10	2760	2980	220
金地鼠	饲 喂	多角体	5×10^8	4	84.2	103.1	18.9
		蒸 馏 水	—	4	86.7	101.4	14.7

(1) 涂皮剂量单位为亿 PIB/ml。

(2) 吸入剂量单位为亿 PIB/M³。

讨 论

国外研究结果表明,在一切可用作防治的微生物病原体中,昆虫病毒是最安全的,对其他生物来说,比化学农药安全的多^[4]。Heimpel 等用棉铃虫、菜夜蛾、粘虫核型多角体病毒及颗粒

体病毒等对小鼠、豚鼠进行试验,未发现试验动物有中毒或致病现象,在该试验中,各试验组有 23 只动物死亡,但除个别试验组外,其它组死亡数均比对照组少,他们认为这些动物的死亡并非由于病毒引起^[4]。我们的试验与上述报道一致。

表 4 试验动物血相测定结果

动物	感染方法	感染剂量	处理 (组)	红细胞总数		白细胞总数		血红素	
				开始 (万/mm ³)	结束 (万/mm ³)	开始 (千/mm ³)	结束 (千/mm ³)	开始 (g)	结束 (g)
家 蚕	亚急性口服	0.5×10 ⁸ /日 PIB	多角体	778	615	13360	12800	7.4	7.7
			对 照	646	573	11000	8940	7.9	8.3
小白鼠	慢性口服	0.2×10 ⁸ 0.2×10 ⁸ /公 斤/日	多角体	530	580	19900	17860	12.7	13.0
			病毒粒子	589	589	14260	13100	11.9	21.1
			对 照	576	588	16920	14980	10	11.2
豚 鼠	腹腔注射	1.5×10 ⁸ 1.5×10 ⁸ —	多角体	508	520	7813	7600	7.6	10.5
			病毒粒子	545	559	8534	8467	10.8	11.9
			对 照	611	528	9100	8940	9	10.2
小白鼠	腹腔注射	200×10 ⁸ 200×10 ⁸ —	多角体	698	724	11890	11877	11.4	10.8
			病毒粒子	575	957	11550	7050	11.3	10.5
			对 照	652	798	9325	9500	11.1	10
家 兔	静脉注射	0.521×10 ⁸ 0.521×10 ⁸ —	多角体	635	643	9800	9625	8.3	8.4
			病毒粒子	598	580	8200	9225	8.4	9.3
			对 照	563	549	7850	8775	7.1	8.6
家 兔	皮下注射	0.5×10 ⁸	多角体	716	777	15120	12500	8.6	8.1
			对 照	706	686	9460	9900	8.2	8.5
家 兔	粘 膜	0.5×10 ⁸	多角体 对 照	632	621	9450	9460	8.3	8.4

Heimpel 等^[5]还对男女 10 人进行试验, 每人在 5 天内吞服 58.2 亿核型多角体病毒, 观察 1 个月, 未发现危害, 2 年后仍很健康。我们在进行动物试验的同时, 也对 10 名饲养棉铃虫及从事棉铃虫核型多角体病毒的生产人员进行全面体检, 他们工作达五年, 但眼、耳、鼻、咽喉、皮肤、胸、腹无异常; 淋巴结、甲状腺不肿大, 体温、血压正常, 神经系统无阳性体征。肺、心膈 X 射线透视、心电图、血、粪、尿常规、尿三胆、黄疸指数、凡登白定性、碘试验及谷-丙转氨酶均正常。血液中未发现棉铃虫核型多角体病毒及其抗体。

参 考 文 献

- [1] Ignoffo, C. M. and A. M. Heimpel: *J. Invertebrate path.* 7: 329—340, 1965.
- [2] Heimpel, A. M.: *J. Invertebrate path.* 8: 98—102, 1966.
- [3] Ignoffo, C. M.: *Bull. ent. Soc. Am.* 14: 265—276, 1968.
- [4] Burges, H. D. and N. W. Hussty: *Microbial Control of Insects and Mites*, 广东省农林学院林学系等译: “昆虫和螨类的微生物防治”, 第一版, 科学出版社, 北京, 1977, 312—314.
- [5] Heimpel, A. M. and L. K. Buchanan: *J. Invertebrate path.* 9: 55—57, 1967.