

## 犬小病毒及第二型腺病毒混合感染病例之研究

呂榮修\* 鄭明珠 林德田 李淑慧 廖永剛

李永林 鄭懋勁 林地發 蔡向榮

### 台灣省家畜衛生試驗所

本報告係一自然感染犬小病毒(Canine parvovirus)及第2型腺病毒(Adenovirus type 2)之混合感染病例。患犬呈有典型之小病毒感染之症狀，包括發熱、厭食、嘔吐及血痢，患犬在發病5天後不治死亡。剖檢結果發現在小腸、胃及膀胱粘膜有充出血，組織病變則包括小腸絨毛嚴重萎縮、腸腺窩腫大或壞死等。此患犬的血便及腸內容物，接種在貓腎臟細胞(CRFK)及犬腎臟細胞(MDCK)分離到二病毒株。經電子顯微鏡檢查，免疫螢光染色法，及交叉血球凝集抑制試驗證明此二病毒為 Canine parvovirus 及 Canine adenovirus type 2。以二分離毒株人工感染2月齡犬，單獨接種 Adenovirus type 2 的犬無臨床症狀，另單獨接種 Parvovirus 及同時接種 Parvovirus 及 Adenovirus type 2 之犬則呈典型之小病毒感染症症狀。

自1978年於美國首先報告由犬小病毒(Canine parvovirus)引起犬出血性胃腸炎(Canine viral hemorrhagic gastroenteritis)以後<sup>(7,11)</sup>，至1980年已蔓延世界各國。

本省犬小病毒病例自1978年年底發現於台北檢疫中心的犬<sup>(4)</sup>之後，在短期時間內蔓延至台中以南<sup>(1)</sup>。本病經朱等<sup>(2,10)</sup>首先以電子顯微鏡檢查證實犬小病毒之存在，但直到1979年11月至1982年流行期，才由筆者等<sup>(4)</sup>從北區病例中首次分離病毒成功。

腺病毒(Adenovirus)通常在人及其他動物引起呼吸器疾病。犬的腺病毒在血清學上可分為兩型：犬腺病毒1型(CAV-1)為犬傳染性肝炎病毒(Infectious canine hepatitis

virus, ICHV)，犬腺病毒2型(CAV-2)則引起犬傳染性喉頭氣管炎(Infectious canine laryngotracheitis)。CAV-2首先由加拿大Ditchfield等<sup>(10)</sup>於1962年在一隻患有喉頭氣管炎病犬分離。台灣有關CAV-2之報告，首見於1976年鍾等<sup>(6)</sup>，以臨床及病理組織檢查發現疑似CAV-2感染病例。其後劉及朱<sup>(5)</sup>、李和朱<sup>(3)</sup>等亦報告在病理組織學檢查及電子顯微鏡檢查發現疑似CAV-2感染病例。惟本省迄今尚無CAV-2病毒分離及鑑定之報告。

筆者等於1988年2月，發現由犬小病毒與腺病毒2型混合感染病例，本病例在臨床上難於區別診斷，故將有關試驗成績報告供為參考。

\*抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌,17:151-158,1991  
台灣省家畜衛生試驗所

## 材料與方法

### 一、病例來源：

於 1988 年 2 月某私人畜醫院送檢之一隻 4 月齡母秋田犬。

### 二、病理學檢查：

除檢查所有臟器之肉眼病變外，並採各臟器病材固定於 10% 中性馬福林液中，以石腊包埋，切成 6  $\mu$ m 厚之切片，行蘇木紫及伊紅 (H&E) 染色，鏡檢。

### 三、細菌學檢查：

各臟器以 Trypticase soy agar 及 Blood agar 進行細菌分離。

### 四、病毒學檢查：

以發病第 3 天之血便及剖檢時所採各臟器以 MEM (Minimum Essential Medium) 分別做成 10 倍乳劑，經反覆冷凍解凍後，以 3,000 rpm 離心 30 分鐘，取其上清液接種於貓腎臟 (Crandell feline kidney; CRFK) 細胞及犬腎臟 (Madin-Darby Canine Kidney; MDCK) 細胞，每日觀察細胞變化，並盲目繼代 3 代。

### 五、電子顯微鏡檢查：

血便以 MEM 製成 10 倍乳劑，及上述感染細胞培養液，以 3,000 rpm 30 分鐘離心後，再經 90,000 rpm 30 分鐘超高速離心，取沉澱物以 2% 磷鎢酸 (phosphotungstic acid) 行負染色 1 分鐘，然後在穿透式電子顯微鏡下觀察。

### 六、免疫螢光染色法

接種病材之細胞於接種後第 3 天將細胞以磷酸鹽緩衝液 (PBS, pH 7.2) 洗 3 次後，以丙酮 (Acetone) 固定，固定後之細胞再以標示 FITC 之犬小病毒抗體 (日本、京都、微生物化學研究所製品) 染色 37°C 30 分鐘後，再以 PBS 沖洗掉未結合之抗體，於螢光顯微鏡下觀察。

### 七、紅血球凝集試驗：

以接種於 CRFK 或 MDCK 細胞發生 CPE 之細胞上清液進行與人 O 型、小白鼠、天竺鼠及豬等四種紅血球細胞之血球凝集試驗。先將上述感染細胞液在 96 孔微量稀釋盤連續 2 倍稀釋後，加入 50  $\mu$ l 的 1% 紅血球懸浮液，

室溫感作 2 小時判讀。

### 八、腺病毒 2 型之交叉血球凝集抑制試驗：

MDCK 細胞分離株 (淡水 B 株) 與犬腺病毒第 1 型及第 2 型單株抗體 (美國 Fort Dodge Lab 分讓) 進行交叉血球凝集抑制試驗。先將單株抗體在 96 孔微量稀釋盤連續 2 倍稀釋後，每孔加入 4 單位血球凝集力價的病毒液，於室溫中感作 15 分鐘後，加入 50  $\mu$ l 的 1% 人 O 型紅血球，混合均勻後靜置室溫 2 小時後判讀。

### 九、人工感染

將 8 隻 2 月齡雜種犬分 4 組，包括小病毒單獨感染組、犬第 2 型腺病毒單獨感染組、混合感染組及對照組，每組 2 隻。犬小病毒 (淡水 A 株) 之感染後以每隻 9 犬口服  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml 病毒液 5 ml，腺病毒 2 型 (淡水 B 株) 之感染係以鼻腔內接種 1 ml，感染後每日觀察臨床症狀，並不定期採取血清測試抗體力價直至感染後 4 週為止。

### 十、犬小病毒抗體調查：

在 1979~1982 年間於本省各地所收集之犬血清以血球凝集抑制 (HI) 試驗測定犬小病毒抗體，其方法係依 Azetaka 等<sup>(8)</sup>所述之方法實施，以 HI 力價在 1:128 及以上者判定為陽性。

## 結 果

### 一、病歷：

本病例未曾接受任何預防注射，於突然發熱體溫 39.8°C 及厭食情況下求診，隔日開始嘔吐及黃色下痢，第三天開始排紅棕色水樣便 (圖 1)，病程持續至第 6 日不治死亡。

### 二、肉眼病變：

胃幽門部、十二指腸、空腸及迴腸粘膜有充出血 (圖 2)，腸腔內充滿水樣血便，腸內寄生蟲檢查陰性，脾臟腫大。

### 三、組織病理變化：

十二指腸、空腸、迴腸絨毛均呈嚴重萎縮，小腸腺窩上皮細胞增生、腫大、空泡化，或擴張成囊腫樣，局部腺窩壞死脫落 (圖 3)。少數腫大的上皮細胞質內可見大而圓的紅色均質物



圖 1 患犬排水精便，肛門周圍之毛髮沾滿血樣粘液



圖 2 患犬小腸顯著充血，由腸管表面即可見



圖 3 患犬之小腸絨毛呈嚴重萎縮，局部腺窩壞死脫落。(100 倍)

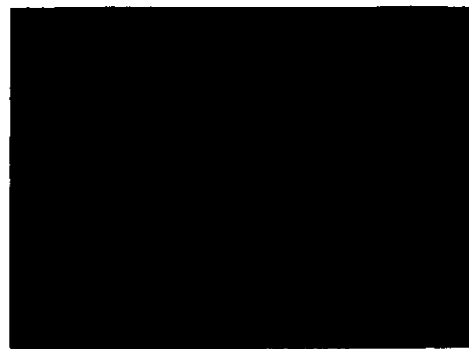


圖 4 患犬之小腸上皮細胞細胞質內可見大而圓的紅色均質物。(400 倍)

(圖 4)。腸間淋巴結之淋巴球顯著減少(圖 5)。胃鬱血、肺泡壁之內襯細胞顯著增生。

#### 四、病毒分離：

發病第 3 天之糞便以電子顯微鏡檢查發現有大小兩種病毒顆粒存在(圖 6)。此糞便病材及各臟器乳劑分別接種於貓腎臟細胞(CRFK)及狗腎臟株化細胞(MDCK)，盲目繼代至第三代時 CRFK 發生細胞病變，MDCK 發生細胞圓化後脫落現象(圖 7)。再經電子顯微鏡檢查證明 CRFK 細胞分離毒株(淡水 A 株)為大小

病毒(圖 8)及 MDCK 細胞分離毒株(淡水 B 株)為病毒(圖 9)。

#### 五、病毒鑑定：

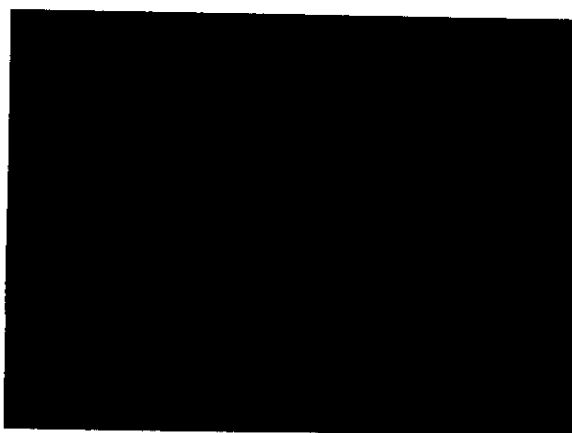
淡水 B 株以陽性犬小病毒抗血清處理抑制犬小病毒之活性後，分別與人 O 型，小白鼠及天竺鼠及紅血球細胞進行血球凝集試驗，結果如表 1。分離株對人 O 型紅血球有 256 倍凝集價，與小白鼠紅血球發生凝集，故分離毒株應為 CAV-2。再以標準 CAV-1 及 CAV-2 單株抗體進行交叉血球凝集抑制試驗，結果如表



圖 5 患犬之腸間淋巴結之淋巴球顯著減少。(400 倍)



圖 6 患犬之糞便病淋在電子顯微鏡可見大小兩種病毒顆粒(單箭頭所指為犬小病毒，雙箭頭所指為犬腺病毒)，(100,000 倍)



(上圖)



(下圖)

圖 7 上圖為正常之MDCK細胞，下圖為淡水B株犬腺病毒 2 型所引起之細胞病變。(200 倍)

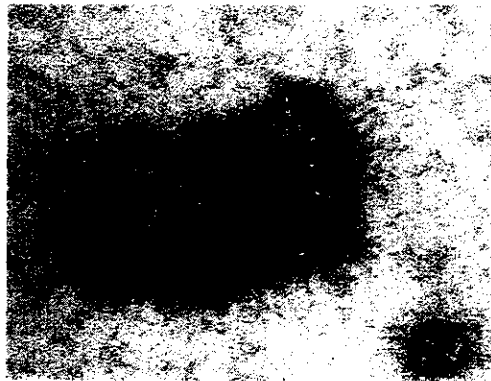


圖 8 淡水 A 株犬小病毒在電子顯微鏡下所見形態 (100,000 倍)

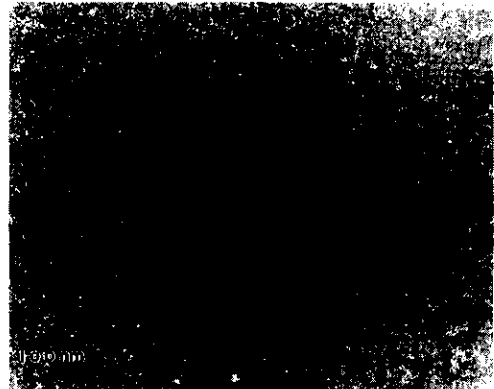


圖 9 淡水 B 株犬腺病毒 2 型在電子顯微鏡下所見形態 (100,000 倍)

表一 淡水 B 株犬腺病毒 2 型之血球凝集，試驗結果

紅血球種類	1 型犬腺病毒標準株	2 型犬腺病毒標準株	淡水 B 株
人 O 型	+	+	+
小白鼠	+	+	+
天竺鼠	+	-	-

表二 淡水 B 株犬腺病 2 型之交叉血球凝集抑制 (HI) 試驗結果

單株抗體	HI 力價
CAV-2 5 C <sub>1</sub> -C-6	8
CAV-2 4 H <sub>1</sub> -A-2	8
CAV-1 2 E <sub>10</sub> -G-4	<2
CAV-1 4 A <sub>1</sub> -C-5	<2

2。分離毒株 CAV-2 單株抗體 C 5 C<sub>1</sub>-C-6 及 4 H<sub>1</sub>-A-2 具有 8 倍 HI 力價，而對 CAV-1 單株抗體 (2 E<sub>10</sub>-G-4 及 4 A<sub>1</sub>-C-5) 並無 HI 力價。

接種淡水 A 株之 CRFK 細胞以犬小病毒螢光標示抗體染色，結果在細胞核可見特異螢光反應 (圖 10)。以 HE 染色在核內亦可見包涵體 (圖 11)。本病毒對豬紅血球具有 128~256 倍之凝集力價。

#### 六、人工感染

人工感染犬小病毒 (淡水 A 株) 2 頭供試犬及犬小病毒 (淡水 A 株) 和 CAV-2 (淡水 B

株) 混合感染組 2 頭供試犬皆有典型的犬病毒性出血性胃腸炎症狀。單獨感染組的抗犬小病毒抗體力價在攻毒後第 7 天開始有明顯上升，混合感染組則在攻毒後第 2 週才有明顯升高 (表三)。而 CAV-2 淡水 B 株單獨感染犬沒有任何可見之臨床症狀，但是抗 CAV-2 抗體力價在單獨感染及混合感染及混合感染組皆在攻毒後第 7 天有明顯升高症狀，血清中 CAV-2 及犬小病毒之抗體亦一直為陰性。

#### 七、犬小病毒抗體調查：

在 1979-1982 年間共調查本省犬隻 437 隻，結果發現每年之抗體陽性率在 60~80% 之



圖10淡水A株犬小病毒感染，CRFK細胞經以螢光標元抗體染色後，在細胞核內呈特异性螢光反應。(1000倍)



圖11淡水A株犬小病毒感染CRFK細胞經以HE染色後，在細胞核內包涵體(箭頭)(1000倍)。

表三、人工感染試驗犬隻血中犬小病毒HI抗體消長情形

接種病毒	犬號	接種後日數									
		0	5	7	8	9	10	14	21	28	
淡水A株犬小病毒	1		<8	<8	512	1024	2048	≥4096	≥4096	≥4096	≥4096
	2		<8	<8	512	死亡	-	-	-	-	-
淡水A株犬小病毒 +淡水B株CAV-2	1		<8	<8	<8	<8	<8	<8	≥8192	4096	2048
	2		<8	<8	<8	<8	<8	<8	4096	死亡	-

表四、人工感染試驗犬隻血中犬腺病毒2型HI抗體消長情形

接種病毒	犬號	接種後日數						
		0	5	7	14	21	28	
淡水B株CAV-2	1		<8	<8	≥512	≥512	512	512
	2		<8	<8	≥512	≥512	≥512	≥512
淡水B株CAV-2 +淡水A株犬小 病毒	1		<8	<8	≥512	≥512	≥512	≥512
	2		<8	<8	≥512	≥512	死亡	-

表五、本省犬隻小病毒抗體調查結果

調查年份	調查犬隻數	陽性犬隻數*	陽性率(%)
1979	99	58	58.6
1980	224	145	64.7
1982	114	87	76.3
合計	437	290	66.4

\*HI力價在 1:128 及以上者判定為陽性

間，總陽性率為 66.4% (表五)

## 討 論

本病例由臨床症狀及病理組織學所見為典型之犬小病毒性胃腸炎，但是經由電子顯微鏡檢查及病毒分離結果卻有兩種病毒存在。經免疫螢光染色及交叉血球凝集抑制試驗證明為犬小病毒及犬腺病毒 2 型混合感染。人工感染犬除了犬小病毒性胃腸炎之典型症狀與病變外，沒有看到任何犬腺病毒 2 型所具有的呼吸道病變，故懷疑病毒可能為弱毒株。

1981 年國內 Chu<sup>(9)</sup> 等人在犬小病毒胃腸炎病例之病理組織學研究中發現有一病例併發腺病毒感染。Chu 等未分離到病毒，但依其所述患犬在肝臟有局部壞死區及腎小球有細胞核有包涵體等病變應為犬腺病毒第 1 型 (CAV-1) 所引起之犬傳染性肝炎，與本病例所得之腺病毒不同型。鍾等<sup>(6)</sup>、劉及朱<sup>(5)</sup>、李及朱<sup>(3)</sup> 先後報告疑似 CAV-2 感染之病例，惟其根據為病理組織學檢查及電子顯微鏡形態學檢查，並未病毒分離與鑑定之報告。筆者等經由病毒分離及以血清型特異性單株抗體進行交叉血球凝集抑制試驗首次證實 CAV-2 病毒在本省之存在。

## 參考文獻

1. 王恆雄。1980，台中地區所發生之犬出血性胃腸炎臨床病例之研究。中華民國獸醫學會雜誌，6：107-102。
2. 朱瑞民、劉振軒、馮一鵬。1979，這是什麼病？動物醫學，6：10。
3. 李萬益、朱瑞民，1982。甚急性犬病毒肺炎—20 日齡幼犬自然感染之一稀有病例。中華民國獸醫學會雜誌，8：165~170。
4. 呂榮修、沈永紹，李永林，林地發，王金和，傅祖慧，(1983)。犬小病毒腸炎病毒之分離與鑑定。中華民國獸醫學會 72 年度學術研究論文宣讀摘要動物醫學，21：17。
5. 梁朝雄，1979。犬病毒性出血性胃腸炎病例。動物醫學，6：11~13。
6. 劉振軒、朱瑞民。1981，應用穿透式電子顯微鏡技術於動物疾病之診斷。中華民國獸醫學會雜誌，7：29~34。
7. 鍾茂賢、洪春彬、何昭堅。1976，類似 A-denovirus Type 2 感染之一病例。中華民國獸醫學會雜誌，2：76~79。
8. Appel, M. J. G., Cooper, B. J., Greisen, H., and Carmichael, L. E. 1978. Status report: Canine viral enteritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173: 1516-1518.
9. Azetaka, M., T. Hirasawa, S. I. Konishi, and M. Ogata. 1981. Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serological survey. Japan J. Vet. Sci. 43: 243-255.
10. Chu, R. M., H. P. Fung, and C. H. Liu. 1981. Pathological lesions of spontaneous parvovirus enteritis of dogs. J. Chinese. Soc. Vet. Sci. 7: 81-88.
11. Ditchfield, J., L. W. Macpheson, and A. Zbitnew. 1962. Association of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of preliminary report. Canad. Vet. J. 3: 238~247.
12. Eugster, A. K., R. A. Bendele, and L. P. Jones. 1978. Parvovirus infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173: 1340~1341.

## CASE STUDY ON A DOG CONCURRENT INFECTED WITH CANINE PARVOVIRUS AND TYPE 2 ADENOVIRUS.

Y. S. Lu\*, M. C. Cheng, D. T. Lin, S. H. Lee,  
Y. K. Liao, Y. L. Lee, M. J. Kwang,  
D. F. Lin and H. J. Tsai

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

In February of 1988, a four-month-old female Akita-breed dog was submitted to our Lab for diagnosis. The dog had fever, anorexia, vomiting, bloody diarrhea and died at 5 days after onset of the disease. Gross lesions included congestion and inflammation on mucosa of small intestine, stomach, and bladder. Microscopic lesions included severe atrophy of villi, swollen and necrosis of crypts of small intestine.

Two viruses were isolated by inoculating faeces and intestinal contents onto Crandell feline kidney cell line and Madin-Darby canine kidney cell line. These viruses were identified as a canine parvovirus

and a type 2 adenovirus by electron microscopy, immunofluorescent antibody staining, and cross-hemagglutinating-inhibition test.

Dogs experimental infected with parvovirus isolate or infected with both parvovirus and type 2 adenovirus isolates had the typical clinical signs and lesions of canine viral hemorrhagic gastroenteritis. Dogs infected with type 2 adenovirus isolate alone did not show any clinical sign.

Total of 437 canine serum samples were collected in Taiwan between 1979-1982. Among them, 70% had positive hemagglutinating-inhibition antibody titers against canine parvovirus.

---

\*Corresponding author

Reprinted from the J. Chinese Soc. Vet. Sci., 17:151-158, 1991  
Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health