

## 新城雞瘟病毒紅血球凝集抗原之研究

呂榮修 楊揚輝 李永林

台灣省家畜衛生試驗所

新城雞瘟病毒石井株以乙醚處理後，不但能使病毒不活化且能提高HA價約15～50倍（HA價40,960～1,310,720倍），又石井毒株以乙醚處理後之HA價上昇效果遠比其他如標準毒株，佐藤、宮寺、B<sub>1</sub>及台灣分離毒株嘉義株或新店毒株為優。石井毒株與其他供試之ND毒株之間其HA抗原性相同，又乙醚處理過程後為防止紅血球解離而添加M/25KIO<sub>4</sub>處理，最後再加同量之含有1% sodium glutamate, 1% Glucose, 20% Lactose 代替10% Glucose其乾燥效果較佳，經製成之冷凍乾燥抗原，HA價在640-10,240倍，如保存於2-5℃可維持力價至1年或以上。

新城雞瘟（Newcastle disease, ND）自1951年來，在台灣已成爲常在化趨勢，及至1968-1969年本病大肆流行，對本病之防疫益感重要，從此之後業者莫不以戰戰兢兢採取有效之新城雞瘟疫苗預防接種計畫，尤其對於ND各種疫苗之免疫抗體上昇及消長或移行抗體之測定均應用紅血球凝集抑制反應（HI test）者爲多，但HI用抗原如每次試驗時要製備，既麻煩又因保存上力價不穩定須每次再測其HA價，非一般試驗者所稱便，爲迎合各使用者之需要，特研製新城雞瘟HI用紅血球凝集抗原一種，茲將其製造方法報告於次供爲參考

### 試驗材料與方法

供試毒株：1976年分讓自日本農林水產省家畜衛生試驗場NDV石井毒株（E-3）及在台灣分離之新店、嘉義及淡水毒株4株供爲試驗。

雞蛋：使用無ND抗體種雞蛋，經孵育9-11日齡接種病毒。

抗原製造方法：以NDV石井毒株 $10^{4.0}$  EID<sub>50</sub> / 0.1ml 接種於10日齡孵育蛋之尿膜腔內，在37-38℃培養3-4（3.5）日，然後取出

放置冰室1夜，抽出尿液於-20℃凍結解凍後，並以3,000 rpm 20分鐘離心，採取上清液加等量之乙醚，經充分振動後，放進37℃恒溫器中6至9小時，再以3,000 rpm離心20分鐘，取抗原部分計量後，加同量之M/25 KIO<sub>4</sub>溶液（1:1），經混合後，放置37℃處理1小時，然後加同量之保護劑（20% Lactose, 1% Sodium glutamate acid及1% gelatin混合液）分裝各1.1ml於真空乾燥瓶冷凍乾燥而成。

HA及HI test：依照川村<sup>(1)</sup>所記載之方法進行。免疫血清之製備：依照山本等<sup>(2)</sup>所報告之方法；即各ND毒株病毒之各4.0ml，第1次接種於家兔靜脈內，第2次接種於兔子腹腔內4-7次所得。

### 結 果

一各種ND毒株經乙醚以不同時間處理後之HA價。

石井毒株感染尿液，經乙醚不活化處理，其處理前之HA價在2,560倍，乙醚處理後15分鐘即上昇至327,680倍，240分鐘（4小時）爲最高，達1,310,720倍，至480分鐘（8小時）後仍維持40,960倍，其他ND毒株如宮寺、佐藤及B<sub>1</sub>毒株與石井毒株相較之下，其HA價並無顯著上昇，又在台灣分離

之嘉義及新店株雖有較高上昇之趨勢，但仍以石井毒株 HA 價為高（圖 1）。

三石井毒株與台灣分離之 ND 毒株間之抗原性。

石井毒株與台灣分離毒，如新店、嘉義及淡水等 3 個毒株之間以及與日本標準毒，佐藤及宮寺株作交叉 HI 試驗均能成立（表

1）。

三試製 HI 用乾燥抗原之保存性。

經研製之 ND HI 用乾燥抗原保存於冰室 1-24 個月，探討其抗原價之變動，結果甚為穩定（如表 2）。

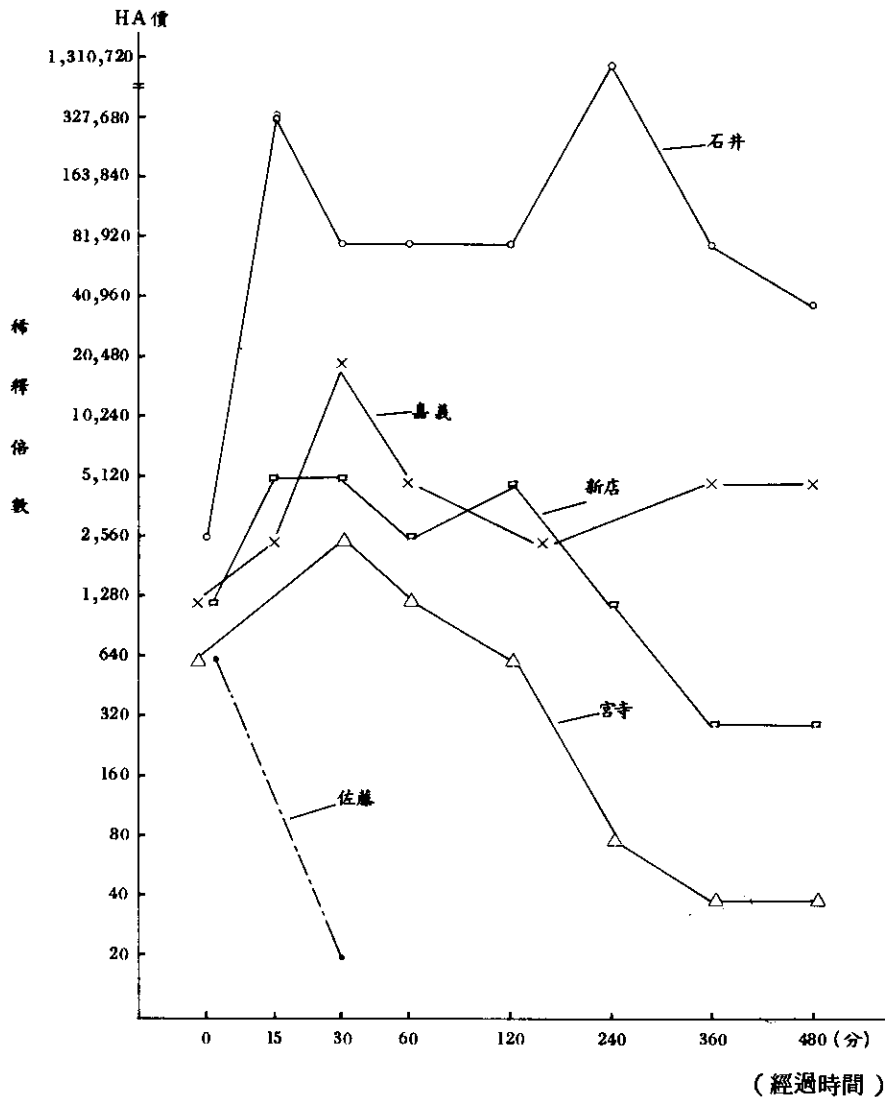


圖 1 石井毒株及其他 ND 毒株經乙醚處理後之 HA 價

表 1 石井毒株與台灣分離毒株間之血球凝集阻止反應

免 疫 血 清	病 毒 株							
	嘉 義	新 店	淡 水	佐 藤	宮 寺	石 井	石 井	石 井
嘉 義	320 *	80	160	640	80	160		
新 店	80	640	320	1,280	160	80		
淡 水	160	320	320	1,280	160	160		
佐 藤	160	160	1,280	1,280	160	160		
宮 寺	80	320	320	1,280	160	160		
石 井	160	320	160	640	320	320		

註 \*：稀釋倍數

表 2 石井毒株乾燥血球凝集素之保存性

製造批號	經 過 月 數											
	1	2	3	4	5	6	8	12	16	20	24	
1	1,280	1,280	1,280	2,560	1,280	1,280	1,280	1,280	640	1,280	1,280	
2	2,560	1,280	2,560	2,560	2,560	1,280	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	
3	10,240	10,240	10,240	10,240	10,240	5,120	10,240	NT	NT	NT	NT	

註 : NT : 未做 \* : 稀釋倍數

### 討 論

筆者等所研製而成品化之NDV 紅血球凝集素已行多年，但因使用者不明其製造方法特為公開並盼能多為改良。

在本所製適用之石井毒株係由日本農林省家畜衛生試驗場所分讓從臨床上並無ND 症狀，而由細菌學診斷為雞傳染性鼻炎 (IC) 之病雞，從氣管及糞便分離之ND 病毒，其病原性與弱毒型 (Lentogenic type) 之B<sub>1</sub>相似，但比B<sub>1</sub>株稍強<sup>(4)</sup>。

一般使用在ND之HI test之HA抗原均用

Formalin 來不活化，但如用乙醚來不活化，不但能使病毒不活化又能增強HA 力價，此因病毒由乙醚，氣仿或 tween 80 處理之後，病毒之 envelope 會斷裂，而從內部放出 nucleocapsid，被不活化之同時會增加紅血球凝集能，蓋因 Envelop 被切成片段之後，各片段發揮紅血球凝集能所致<sup>(2,7)</sup>。

又ND之HA 試驗，因一度被凝集之紅血球如放在37°C或室溫之下，病毒很容易自紅血球 elution，此亦因病毒之 envelope 有 neuraminidase 會破壞紅血球之 receptor 所致，為避免紅血球與病毒之 elution 可添加 KIO<sub>4</sub> 後即能避免<sup>(2,7)</sup>。因此所製造之ND 紅血球凝集不會受到

elution 所影響，在判讀時間超過後仍能判定，既省時又為正確。

本抗原如用微量法試驗更為經濟，可大量檢查。

又 KIO<sub>4</sub> 添加之後，原法<sup>(3)</sup>加 10% Glucose 予以中和，但筆者等改用加同量之 1% Sodium glutamate acid, 1% Gelatin 及 20% Lactose 為保護劑，其乾燥後之成品頗為美觀且能保存至 2 年力價不變。

至於石井毒株比其他 ND 毒株，經乙醚處理後之 HA 價提升幅度及穩定性較優之原因，可能在於毒株間之差異與增殖性較佳為因。

### 參考文獻

1. 川村 齊 1968 鶏ウイルス病に關する血清反應. 391-398 (堀内貞治, 川村 齊, 關令二編) 鶏病圖說, 第一版, 日本畜産振興會東京。
2. 川村 齊, 吉田 勳 1968 ニューカッスル病. 12-37 (堀内貞治, 川村 齊, 關令二編) 鶏病圖說, 第一版, 日本畜産振興會東京。
3. 増田 久 1972 ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素. 119-120 (農林省畜産局) 動物用生物學的裝劑基準, 農林省 東京。
4. 清水文康 1966 野外からえた一弱毒株の性状. 家衛試年報 16-68。
5. 椿原彦吉 1967 エーテル處理の赤血球凝集素(HA)に對する作用. 家衛試年報 23-24
6. 山本富史, 小川信雄, 西村豐, 田村和之 1971 抗ニューカッスルウイルス家兔血清の簡易作成法の検討. 動藥檢年報 8, 23-28。
7. 吉田 勳 1982 ニューカッスル病. 21-46 (堀内貞治編) 鶏病診斷 第一版 家の光協會 東京。

## RESEARCH ON PREPARATION OF HA ANTIGEN OF ND VIRUS

Y. S. LU, Y. F. YANG, Y. L. LEE

### SUMMARY

The HA titre of Ishi strain ND virus after treatment with ether were elevated for 15–50 times (HA titre 40,960~1,310,720). The rise of HA titre of Ishi strain after treatment was much higher than other standard strain such as sato strain, Miga-Tera strain and field strain isolated in Taiwan such as Chia-I and Shin-Ten strains. The antigenicity were the same between the Ishi strain and other strain being tested. To avoid the elution of the RBC after treatment with ether,  $M/25 KIO_4$  were added, and equal amount of protective agent which contained 1% sodium glutamate acid, 1% gelatin, and 20% lactose were added to substitute for 10% glucose.

By the method mentioned above, the better frozen-drying antigen product were obtained. the titre of this product were 640 ~ 10,240, and will maintained its titre for a year or above when being preserved in 2–5°C.