

猪瘟病毒與猪水疱病毒之濃縮試驗

陳忠松 黃天祥 何維莊 賴秀穗

以硫酸銨和 Polyethylene glycol (PEG, 分子量6000) 來濃縮猪水疱病 (SVD) 和猪瘟 (HC) 病毒。SVD 病毒液以含 8% (W/V) PEG 濃度濃縮者, 在 4°C 作用 3 小時病毒回收率幾達 100%, 但作用 18 小時則僅有 5.6% 的回收率。而猪瘟病毒液在以含 8% PEG 濃縮後, 不論作用 3 或 18 小時, 病毒回收率均幾達 100%。

由於許多試驗上的需要, 病毒的濃縮是十分重要的, 譬如可供作免疫擴散用的抗原製備⁷, 血清學反應用的抗原¹¹, 純化病毒時所須^{8,10}, 或高力價疫苗的製造⁹等, 皆得先將病毒予以濃縮。

目前使用于病毒濃縮的方法甚多, 如用超高速遠心¹⁰, ultra-filtration, 或用有機溶劑, 或鹽類沉澱法, 或高分子聚合體的使用。但病毒種類的差異, 或所須條件的不同, 或是濃縮量的多寡, 效果有時有顯的不同, 例如超高速遠心, 所能濃縮的呈顯然有限; 又同一方法對不同病毒的效果相差甚大, 如用 PEG (分子量 6000) 在 6% 濃度時對 Bovine Enterovirus 濃縮效果甚佳, 但對 Bovine Parvovirus 則效果極差¹²。因此本試驗針對實際上所需要, 以鹽類和高分子的聚合體分別對二種病毒加以濃縮, 比較其效果, 以供實際操作使用。

材料和方法

1. 病毒株:

猪瘟病毒: 以 A₇₆ 病毒株供作試驗, 此病毒原由日本家畜衛生試驗場分讓, 目前在本所猪瘟股供猪瘟抗體測定用; 以初代猪睪丸細胞繼代 4 次, 少量分裝儲存于 -70°C。

猪水疱病毒: 由美國梅島動物疾病中心引進⁷, 以 MVPK 細胞繼代保存于 -70°C。

2. 濃縮過程:

將猪瘟病毒 (HC-A₇₆) 和猪水疱病毒 (SVD) 分別在猪睪丸初代細胞和 MVPK 大量增殖後, 經快速凍結, 溶解二次後, 遠心除去細胞碎片。每種病毒液各分成二組, 分別以含 20%, 30% 和 50% 的 (NH₄)₂SO₄ 及以含 6% 和 8% 的 PEG (6000) 濃縮。各組分別在 4°C 冰箱中以碎鐵攪拌器適度攪拌 3 小時或 18 小時。攪拌作用時間到時, 將病毒液在低溫離心機離心, 9000rpm 遠心 40 分鐘 (Beckman)。再將沉澱物以 0.15 M NaCl, PH 7.5 的 0.2M Tris-Buffer 依原病毒液的 1/100 量予以溶解。然後將各組濃縮液, 上清液和原液分別在猪睪丸細胞以 END 法測定猪瘟毒力價, 而猪水疱病毒則以 MVPK 細胞來定量。二次濃縮試驗, 成績之平均值做為結果。

結 果

1. 猪水疱病毒的濃縮:

不同濃度的 (NH₄)₂SO₄ 用來處理猪水疱病毒, 作用 3 小時和 18 小時後, 以 50% 濃度的硫酸銨效果最好, 其上清液病毒力價殘存率僅剩 0.1% 和 0.0%, 但其沉澱物之病毒力價回收率, 在硫酸銨系列中皆甚差。

而在 PEG 處理組中, 當濃度為 8%, 作用 3 或 18 小時後, 其殘存率皆為 0.3%, 但作用 3 小時

的，其回收率達到100%，其力價亦達 $10^{9.0}$ 10^{10} TCID₅₀/0.05ml。如表1。

2. 猪瘟病毒的濃縮：

在硫酸銨組中，作用3小時後，則對30%及50%而言，其殘存量尚有1%，但作用18小時，50%的殘存量可達0.1%，但二者回收率都甚差。

而在PEG組中，用6%作用3或18小時，其殘存量都高達32%，其回收率亦不高，但當PEG為8%時，則3或18小時的作用效果都相同，殘存率可降為10%，而回收率可達到100%，其力價可升為 $10^{8.5}$ TCID₅₀/0.05ml。如表1。

Table 1 The Concentration of SVD and HC-A 76 Viruses Treated with Ammonium Sulfate or Polyethylene Glycol (PEG)

Virus	Period for Treatment	Final Conc. of Treatment	Original Infectivity	Residue Infectivity	Residue Rate	100x Conc. Recovery Infectivity Rate	
SVD	3 hours	20% (NH ₄) ₂ SO ₄	7.0	6.75	36 %	5.75	0.0 %
		30% (NH ₄) ₂ SO ₄		6.5	32 %	7.0	1 %
		50% (NH ₄) ₂ SO ₄		4.0	0.1 %	7.25	1.7 %
		6%PEG		5.5	32 %	8.0	10 %
		8%PEG		4.5	0.3 %	9.0	100 %
	18 hours	20% (NH ₄) ₂ SO ₄	7.0	6.5	32 %	5.72	0.0 %
		30% (NH ₄) ₂ SO ₄		5.5	3.2 %	6.25	0.2 %
		50 (NH ₄) ₂ SO ₄		3.5	0.0 %	7.5	3.2 %
		6%PEG		6.75	56 %	7.25	1.7 %
		8%PEG		4.5	0.3 %	7.75	5.6 %
HC-A76	3 hours	20% (NH ₄) ₂ SO ₄	4.5	4.0	32 %	5.0	32 %
		30% (NH ₄) ₂ SO ₄		2.5	1 %	5.5	10 %
		50% (NH ₄) ₂ SO ₄		2.5	1 %	5.3	10 %
		6%PEG		4.5	32 %	5.3	10 %
		8%PEG		3.5	10 %	6.5	100 %
	18 hours	20% (NH ₄) ₂ SO ₄	4.5	3.5	10 %	5.5	10 %
		30% (NH ₄) ₂ SO ₄		3.5	10 %	4.5	1 %
		50% (NH ₄) ₂ SO ₄		1.5	0.1 %	4.5	1 %
		6%PEG		4.0	32 %	6.0	32 %
		8%PEG		3.5	10 %	6.5	100 %

Infectivity : TCID₅₀/0.05ml (log 10)

討 論

猪水疱病毒和猪瘟病毒經硫酸銨或PEG濃縮處理，在不同濃度時，其殘存量差異甚大，而在作用時間上則差異較小，如表1中，猪水疱病毒在50% (NH₄)₂SO₄作用下，其殘存量甚低，在千分之一以下，而作用時間則無多大差別。用PEG 6%時則殘存率甚高，但8%濃度比較，則前者高出後

者100倍—180倍，可見8%濃度較適合于SVD病毒濃縮。類似情形亦見于豬瘟病毒的濃縮，當硫酸銨濃度或是PEG濃度高的，其殘存率越低，但二者相比仍以硫酸銨效力大。如以病毒類相比較，則SVD和HC的殘存率對硫酸銨而言，差異性不大，但對PEG而言，則SVD效果大於HC病毒，前者殘存率0.3%，後者仍有10%。

而在回收率的比較，由表中可明顯的看出，SVD病毒只有在8%PEG作用3小時可回收100%，使力價由原來的 10^7 升為 10^6 TCID₅₀/0.05ml外，其餘各組效果都極差。而在HC病毒方面，則在8%PEG不論作用3小時或18小時皆可達到10%，其餘各組亦不理想。任何病毒之沉澱回收，事實無法達到百分之百，本試驗以8%之PEG對SVD及HC之回收達100%，純由病毒適定力價時所引起之錯誤。

有關用PEG濃縮病毒的報告，效果良好的有Togavirus, Polyoma Virus, SV₄₀³, Encephalomyocarditis Virus⁶, Parainfluenza—3 Virus, Bovine Enterovirus, Bovine Adenovirus, Bovine Parvovirus¹²等；而效果不好的病毒，如BVD, IBR, Bovine Reovirus和Ibaraki Virus¹²等。其間原因，Sugimura等認為病毒雖已沉澱，但無法由沉澱物中再度溶解所致。有關其溶解度之差異，Clark和Lister認為是因病毒之表面積對其體積比率差別，以及表面電子特性所引起的。

在本試驗中SVD和HC病毒在8%PEG濃縮，其效果不如10%或12%的PEG，而Bovine Enterovirus則剛好相反，若用6%或8%PEG，則回收率僅為10%或12%濃度的十分之一¹²。

參 考 文 獻

1. Butler, J. E. & Maxwell, C. F., (1972): Preparation of Bovine Immunoglobulins and Free Secretory Component and Their Specific Antisera J. of Dairy Science 55, 2; 151—164.
2. Clark, M. F. & Listery R. M., (1971): The Application of Polyethylene Glycol Solubility-Concentration Gradients in Plant Virus Research. Virology 43; 338—351.
3. Friedmann, T. & Haas, M., (1970): Rapid Concentration and Purification of Polyoma Virus and SV40 with Polyethylene Glycol. Virology 42; 248—250.
4. Hazlett, D. T. G. & Derbyshire, J. B., (1977): Neutralizing Activity in the Gastrointestinal Contents of Piglets Vaccinated with an Ethylenimine-Inactivated Porcine Enterovirus. Can. J. Comp. Med. 41; 160—165.
5. Hebert, G. A., Pelham, P. L. & Pittman, B., (1972): Determination of the Optimal Ammonium Sulfate Concentration for the Fractionation of Rabbit, Sheep, Horse and Goat Anisera. Appl. Microbiol. 25; 26—36.
6. Keer, I. M. & Martin, E. M., (1972): Simple Method for the Isolation of Encephalomyocarditis Virus Ribonucleic Acid. J. Virol. 9; 559—564.
7. Lai, S. S., Ho, W. C., Huang, T. S. & Wan, S. K., (1976): Studies on the Rapid Diagnosis of Swine Vesicular Disease. Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 13; 19—23.
8. Laude, H., (1977): Improved Method for the Purification of Hog Cholera Virus Grown in Tissue Culture. Archives of Virology 54; 41—51.
9. McSharry, J. & Benzinger, R., (1970): Concentration and Purification of Vesicular Stomatitis Virus by Polyethylene Glycol "Precipitation": Virology 40; 745—779.

10. Okuda, K., Itoh, K., Miyake, K., **Morita, M.**, Ogonuki, M. & Matsui, S., (1975) : Purification of Japanese Encephalitis Virus Vaccine by Zonal Centrifugation. *J. Clin. Microbiol.* 1 ; 96—101.
11. Sakaki, K., Suphavitai, P. & Kongthon, S., (1978) : Indirect Complement Fixation Test with Foot-and Mouth Disease Virus Antigen Concentration by polyethylene Glycol Precipitation. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 18 ; 8—17.
12. Sugimura, T. & Tanaka, Y., (1978) : The Use of Polyethylene Glycol in Concentration and Purification of Several Bovine Viruses. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 18 ; 53—57.

Studies on the Concentration of Hog Cholera and Swine Vesicular Disease Viruses

Chen, C. S., T. H. Huang, W. C. Ho and S. S. Lai

Summary

Swine vesicular disease (SVD) and hog cholera (HC) viruses were precipitated with ammonium sulfate or polyethylene glycol (PEG, MW 6,000) at 4°C. SVD virus fluid treated with 8% (W/V) of PEG at 4°C for 3 hours was found the best concentration for precipitation. The recovery rate almost reached to 100%. However, at the same condition but treated for 18 hours, the recovery rate of SVD virus was poor, only 5.6%. 8% of PEG was also found excellent concentration for precipitation of HCV at 4°C either for 3 or 18 hours period. Ammonium sulfate was found poor for the precipitation of SVD and HC viruses.