

# 鷄馬立克病疫苗之研製

## 一、種毒之建立

謝快樂 蕭終融

臺灣省家畜衛生試驗所

### 摘 要

HVT 病毒，FC—126 株，以無特定病原 (SPF) 之鷄胚胎細胞培養繁殖後收集儲存於液態氮，經雜菌檢查，黴菌檢查，麥可菌檢查及沙氏桿菌檢查均屬陰性，其經接種鷄胚胎後抽尿液檢查亦無具血球凝集性病毒之污染；該種毒以十劑量 (15,000 PFU/ 鷄) 接種一日齡小鷄後觀察四個月後解剖，均無馬立克病之臨床症狀及病灶，顯示其安全性沒問題，該種毒以一劑量接種一日齡小鷄後於二週齡時以臺灣分離之馬立克病強毒攻擊，顯示有九成以上之保護力，該種毒已符合美國聯邦法規 (CFR) Title 9, 第一章, 第113條165款之規定，合於做為疫苗生產用之種毒。

### 緒 言

鷄的馬立克病由疱疹病毒在鷄體內引起淋巴細胞無限制的繁殖<sup>(3)</sup>，而致害鷄全身，尤對背部神經結，周邊神經及性腺 (卵巢) 親和性大<sup>(8)</sup>，因它為一種藉空氣傳播的疾病<sup>(2,9)</sup>，故其散播快且分布極廣，本病對本省的養鷄界致害也相當嚴重<sup>(5)</sup>。

Kawamura 等<sup>(4)</sup>首先由火鷄分離到一株疱疹病毒經 Witter 等<sup>(10)</sup>及 Okazaki 等<sup>(6)</sup>證明火鷄分離的疱疹病毒 (HVT) 與馬立克病疱疹病毒間有抗原關係存在，對鷄不引起任何病變，注射新生小鷄可使對馬立克病有抵抗力，目前已廣泛的被世界各國藥廠使用來製造馬立克病疫苗，美國自使用該疫苗後，馬立克病的發生率已顯著的降低<sup>(7)</sup>，本省自民國61年起開始由世界各國進口該項疫苗，馬立克病的發生率亦有顯著的降低，唯每年進口的數量有增加的趨勢，年進口量有七千萬劑量左右，花費國家外匯每年達六十萬美元之數，本省實有自行製造該疫苗以求自給自足之必要。

本試驗之目的即為建立製造用種毒供該疫苗之生產。

### 材料與方法

病毒：HVT, FC—126 株，由美國麻州大學帶回，培養於 SPF 鷄胚胎初代纖維母細胞培養後收集儲存於液態氮備用。

馬立克病強毒株，由臺中縣取得有馬立克病臨床症狀之病鷄，取其腎臟以胰蛋白酶消化後培養腎細胞 7~10 天，有典型的馬立克病 Plaques 出現後以 Trypsin-Versene 溶液消化，取細胞再接種於馬立克病鷄之腎臟細胞培養上，如此經 5 代得高力價之馬立克病強毒，收集儲存於液態氮備用。

純度測定：

雜菌和黴菌之測定：Fluid thioglycollate Media 用於測定雜菌和黴菌，十支 HVT 種毒，各支種毒培養於二支前述培養基中，一支置 37°C 暖房一支置室溫 (20°—25°C) 後觀察 14 天。

麥可菌之測定：PPLO Broth (Frey's media) 和 PPLO agar 用於測定麥可菌；HVT 種毒 1 c.c. 接種於 100 c.c. 的 PPLO broth 內充分混勻置 37°C 培養 14 天，於培養後的第三、七、十四天各取 0.1 c.c. 培養液接種於 PPLO agar 後，培養於含 4—6% CO<sub>2</sub> 之玻璃皿內 37°C 14

天取出於 100× 顯微鏡檢查有無麥可菌菌落。

沙氏桿菌之檢查：5 c.c. 的 HVT 種毒接種於 100 c.c. 的 tryptose broth media, 37°C 24 小時後取 1 c.c. 接種於 MacConkey agar 再於 37°C 培養 48 小時觀察有無沙氏桿菌菌落。

血球凝集性病毒之測定：0.2 c.c. 的 HVT 種毒接種於 10 日齡雞胚胎的尿囊腔每支 HVT 種毒接種五個雞胚胎，同批的五個無接種的雞胚胎當陰性對照，於 37°C 3 ~ 5 天採取雞胚胎的尿液以 0.5% 雞紅血球作血球凝集反應，觀察有無凝集。

#### 安全試驗：

四十五隻一日齡仔雞分成三組，第一組每隻雞腹腔接種 10 劑量 (15,000 PFU) 的 HVT 病毒，第二組每隻雞腹腔接種 2,000 PFU 的馬立克病強毒，第三組為無接種之對照，各組分別飼養，並觀察臨床症狀，觀察期間有死亡的即解剖求取病因，第二組於十週齡時全數殺死解剖，觀察馬立克病病灶，而第一及第三組則於四個月齡時解剖檢查。

#### 病毒力價測定：

HVT 病毒於雞胚胎纖維母細胞培養 (CEF) 測定力價，馬立克病毒則以 CEF 或雞腎臟細胞 (CK) 測定力價。

#### 免疫原性試驗：

四十五隻一日齡仔雞分三組用於本試驗，第一組於一日齡時腹腔注射一劑量 (1,500 PFU) 之 HVT 種毒，第一及第二組於二週齡時腹腔接種馬立克病強毒 (2,000 PFU/雞) 第三組為無接種之對照，各組分別飼養觀察馬立克病之臨床症狀，於十週齡時解剖檢查有無馬立克病病灶。

## 結 果

#### 純度試驗：

HVT, FC-126 株，於 SPF 雞胚胎纖維母細胞一次繼代後用於純度試驗。

於 fluid thioglycollate media 內培養於 37°C 或室溫 (20—25°C) 培養 14 天後無任何雜菌或黴菌被發現。

以 PPLO broth media 培養二週，並於培養中之第三、七、十、十四天各取部分培養於 PPLO agar 37°C 14 天亦無任何麥可菌之發育。同樣之培養基以麥可菌 S<sub>6</sub> 株培養於 5 ~ 7 天即發育良好。

HVT 種毒接種於 tryptose broth media 24 小時後接種於 MacConkey agar 再培養 48 小時並無沙氏桿菌之發育。

HVT 種毒接種雞胚胎所採尿液對 0.5% 雞血球無血球凝集性，而新城雞瘟感染之雞胚胎尿液則可迅速地凝集該血球。

#### 安全性試驗：

第二組的雞 (馬立克病注射組) 於十週齡時解剖，第一和第三組於四個月齡解剖觀察有無馬立克病病灶 (包括背部神經結，坐骨神經，性腺和內臟器官)。第一和第三組各一隻第二組有四隻於觀察期間死於非特異之病因 (包括葡萄球菌症及雞痘)，解剖之結果列於表一 (Table 1)。

#### 病毒力價測定：

圖一為 HVT 病毒於 CK 細胞上顯示之特徵性細胞變性，圓的變性細胞羣圍繞著一中空區域，每盤 (直徑六公分之圓盤) HVT 病毒充分發育後測得之力價介於  $2-5 \times 10^5$  PFU/盤。

#### 免疫原性試驗：

表一顯示一日齡雞接種一劑量 HVT 病毒後再以馬立克病強毒攻擊結果有 92.9% 之防禦力，而二種國外進口之乾燥馬立克病疫苗則有 85.8% 及 70% 之防禦力，無免疫接種僅注射馬立克病強毒的十一隻雞中之七隻有典型的馬立克病病灶 (如圖二)。

野外試驗，一日齡接種一劑量 HVT 病毒及無接種的對照於二週齡時各取回十隻予以強毒攻擊

，到十週齡時解剖檢查，免疫接種雞全無可見之 MD 病灶，而對照雞則九隻中之七隻有 MD 病灶（表一），另一隻對照雞於六週齡時死於雞痘感染。

## 討 論

疫苗的好壞取決於種毒、原料動物、安定劑、病毒力價等條件之配合，其中先決條件是優良的種毒；本試驗所用種毒雖為廣泛使用已久之 FC-126 株，但依一般疫苗製造的原則，種毒經過純度，安全性及免疫效力試驗建立 Master Seed virus 後，疫苗成品由此種毒繼代製造，不得超過五次以上的繼代，否則即需再行檢討重新建立種毒，本試驗即依照美國聯邦法規 (CFR) <sup>(1)</sup> Title 9, 第一章第113條165款之規定，測定其純度，安全性及免疫效力，均符合規定，已可供為製造用種毒。

目前大量生產組織培養之技術亦已建立，正進一步檢討冷凍乾燥疫苗之製造技術與選擇適當之安定劑，同時亦正籌建 SPF 雞羣以供應今後生產及檢定疫苗所需之種蛋。

## 誌 謝

本報告承蒙農復會經費補助，國科會研究獎助，李主任委員崇道，鍾組長博，林技正再春及陳所長守仕之鼓勵與指導，在此謹致衷心的謝忱。

Table 1. Immunogenicity and Safety Tests of HVT Seed Virus in Chicks

Groups	No. of chicks used	Doses	MD challenge <sup>1</sup>	Birds with MD lesion / necropsied	
				Birds with MD lesion	Birds <sup>2</sup> necropsied
Tested vaccine <sup>3</sup> (cell-associated)	15	1	yes	1/14	
〃 〃	15	10	No	0/14	
Commercial vaccine (cell-free)	15	1	yes	3/10	
〃 〃	15	1	yes	2/11	
Control	15	0	yes	7/11	
Control	15	0	No	0/14	
Tested Vaccine (cell-associated)	10	1	yes	0/10	
Control	10	0	yes	7/9	

1. MD virus used for challenge was isolated from chickens with MD lesions (collected from Taichung)
2. Chicks were vaccinated at 1-day-old, challenged at 2-weeks-old, and necropsied at 10weeks of age.
3. Seed virus propagated in SPF CEF cultures.

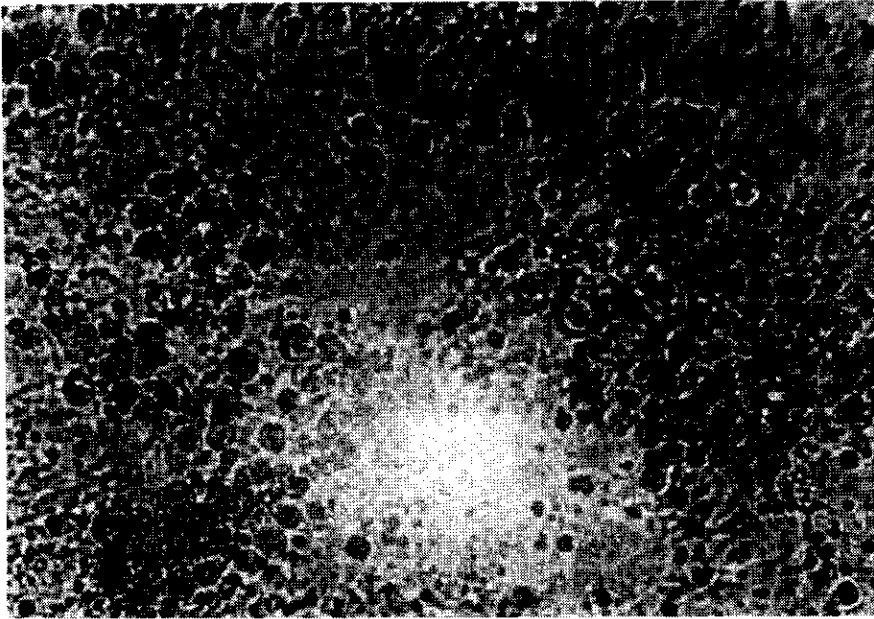


Fig. 1 Typical HVT plaque, round refractory cells surrounding a clear area on CK culture

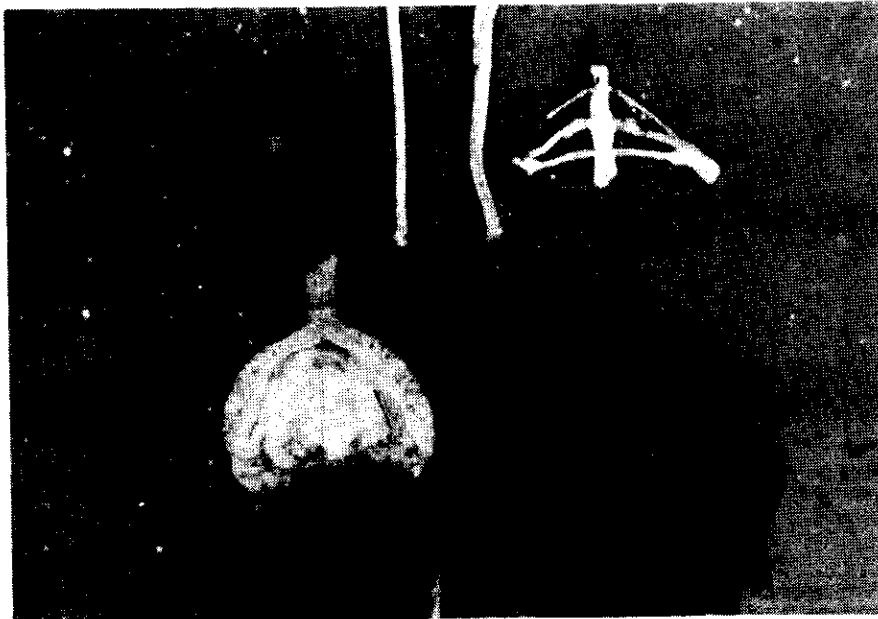


Figure 2. Typical MD gross lesions. 1. Spleen with spots of lymphoma. 2. Unilateral enlargement of sciatic nerve . 3. Unilateral enlargement of dorsal root ganglion. 4. Swelled & hemorrhagic proventriculus. 5. Liver with lymphoid nodules.

## 参 考 文 献

1. Code of Federal Regulations (1976). Title 9 : Animals and Animal Products. Chapter 1, #113.135 & #113.165 : 279—308.
2. Colwell. W. M., and Schwittle S. C. (1968). Studies on acute Marek's disease. VII. Airborne transmission of the GA isolate. *Avian Dis.* 12 : 724—729.
3. Hitchner, S. B. ; Domermuth, C. H. ; Purchase, H. G. ; William, J. E. (1975). Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by American association of Avian pathologists. P. P. 235—250.
4. Kawamura, H., D. J. King, Jr., and D. P. Anderson (1969). A Herpesvirus Isolated from Kidney Cell Cultures of Normal Turkeys. *Avian Dis.* 13 : 853—863.
5. Lu, Y. S., C. M. Huang, K. L. Shieh, and Y. L. Lee (1970). A Study of Poultry Disease at the Research Institute for Animal Health in Taiwan. *Taiwan Agriculture Quarterly* 9 : 1—7.
6. Okazaki, W., Purchase, H. G., and Burmester, B. R. (1970). Protection against Marek's Disease by Vaccination with a Herpesvirus of Turkeys. *Avian Dis.* 14 ; 413—429.
7. Purchase, H. G. (1975). Progress in the Control of Marek's Disease. *Am. J. Vet. Res.* 36 : 587—590.
8. Sevoian, M. ; and Chamberlain, D. M. (1962). Avian Lymphomatosis : I. Experimental Reproduction of the Neural and Visceral forms. *Vet. Med.* 57 : 500—501.
9. Sevoian. M., Chamberlain, D. M., and Larose, R. N. (1963). Avian lymphomatosis : V. Air-borne transmission. *Avian Dis.* 7 : 102—105.
10. Witter, R. L., Nazerian, K., Purchase, H. G., and Burgoyne, G. H. (1970). Isolation of a Cell-associated Herpesvirus Antigenically Related to Marek's Disease Virus. *Am. J. Vet. Res.* 31 : 525—538.

## Studies on the Production of Marek's Disease Vaccine

### I. The Establishment of the Master Seed Virus

Happy K. Shieh and J. R. Shiau

Taiwan Provincial Institute for Animal Health

### Summary

The HVT virus, strain FC-126, after propagated in SPF CEF cultures, harvested, and stored in liquid nitrogen, shown no bacteria, fungi, or mycoplasma contamination. The seed virus did not contaminate with any hemagglutinating virus. High level (10 doses/bird) of the virus did not induce in chicks inoculated at one day of age any MD clinical signs or MD gross lesions during the 4-months experimental period. The seed virus could protect the chicks against challenge of MD virus isolated from chickens in Taiwan. The virus meets the requirements quoted in "Code of Federal Regulations" Title 9, Chapter 1, § 113. 165 as a Master seed virus, and is ready for the use in production of the vaccines.