

# 猪水疱病毒(SVD)與柯沙奇 B 5 型病毒 (Coxsackie Virus B5) 抗原性之比較

賴秀穗, P. D. Mckercher\*, D. M. Moore\*

J. H. Gillespie\*\*

\*Plum Island Animal Disease Center,

Green Port, Long Island, New York, U. S. A.

\*\*Cornell University, Ithaca, N. Y. U. S. A.

## 摘 要

雖然 SVD 與 Coxsackie virus B5 病毒之抗原性很相似但可用中和試驗及免疫擴散法區別。在各種 SVD 分離毒中, UKG 27/72 與 HK 71 之抗原性稍異, 但與 Italy/66 株則差異甚大。Faulkner prototype 及最近分離之 Coxsackie Virus B5 病毒之抗原性之不同亦可測出。Coxsackie Virus B5 Faulkner prototype 之抗原性與 SVD 病毒較接近, 尤其與 Italy/66 分離株最接近, 而與最近分離之 Coxsackie B5 病毒反而差異較大。

## 緒 言

猪水疱病(SVD)最早於1966年在意大利被發現(7)。由病原的物理化學性狀得知係為一種腸內病毒。隨後於1971年在香港發生(6)。1972年到1975年陸續在歐洲及亞洲發生(1)。1973年Graves(4)發現SVD血清可以中和Coxsackie Virus B5 (CB5)病毒並假設SVD病毒可能由人類之CB5病毒演變而來。隨後由Brown等(2)指出雖然SVD與CB5病毒之抗原性很相近但能以免疫擴散法區別之。

本試驗目的在以交叉中和試驗及免疫擴散法測定各種SVD及CB5病毒抗原性之不同。

## 試驗材料及方法

病毒: 猪水疱病毒(SVDV):

UKG27/72、HK71由英國分讓, 經2代IBRS-2細胞及3代MVPK細胞增殖, 其力價分別為log 9.50及log 9.26 PFU/ml。

Italy/66亦由英國分讓後繼代於MVPK4代, 力價為log 7.50 PFU/ml。

柯沙奇B5型病毒(CB5):

Faulkner Strain及最近分離1401-72毒株, 係由Dr Axelnod分讓(美國紐約州阿巴尼衛生中心)分別增殖Vero細胞, 力價為log 8.90及log 8.62 PFU/ml。1401-72分離毒係於1972年由非化膿性腦炎病患之脊髓液分離而來。

動物: 新生小白鼠, 供增殖SVD及CB5病毒, 其感染腦供為製造高度免疫血清之抗原。

天竺鼠(約200-300公克)供為製造抗猪水疱病及CB5病毒血清。

抗血清製造：將 SVD 或 CB5 病毒腦內注射於新生小白鼠48—72小時後收集感染之腦，做成乳劑後，以氯仿 (Chloroform) 抽取病毒抗原，將此病毒抗原加 Freud Complete Adjuvant 後 0.5ml 皮下注射於天竺鼠。10天後再補強 1ml，再經10—14天後抽血測定血清中和抗體力價。如其血清中和力價不高，則再皮下補強 1ml 抗原，經 2 週後放血分離血清並於 56°C 30' 非働化。

病毒灶抑制測定 (Plaque Reduction test)：本法係採用連續稀釋血清及定量之病毒法。將被測血清以 N-2-Hydroxyethyl-Piperazine-N'2-ethane-Sulfonic acid (HLH-HEPES) 稀釋液 2 倍稀釋後，加入等量之病毒液，而使最後混合之病毒濃度每 0.1ml 含有 50—70 PFU 然後將血清病毒混合液置 37°C 之水浴槽內 1 小時，後將 0.1ml 之每一稀釋階段之血清病毒混合液接種於 4 日齡的 MVPK 單層細胞，該單層細胞培養在 4 洞之塑膠平皿內 (直徑 35mm) 每一稀釋階段使用 4 洞之單層細胞，經 37°C 1 小時之 CO<sub>2</sub> 孵卵器內感作 (時搖之使病毒均勻分佈於細胞面上) 後以滅菌之 PBS 洗滌三次。再以 1% 之 methyl cellulose 復蓋之置 37°C CO<sub>2</sub> 孵卵器培養。對照病毒加入等量之稀釋後同法處理之。培養 36 小時後倒掉 methyl cellulose 並以 Giemsa-formalin 混合液染色之。風乾後數病毒灶數目。

抗原之純化：以旋轉培養瓶大量增殖各種 SVD 及 CB5 病毒。該病毒液以 7,700g 離心 10 分鐘後，上清液混以 8% Polyethylene Glycol (分子量 6000)，在 4°C 攪拌 2 小時後經 12,000g 離心 15 分鐘，沈澱物再以 Tris-buffered saline (原來  $\frac{1}{100}$  體積) 溶解，將此溶液加在 CsCl gradient 上以 120,000g 離心 2.5 小時 (SW 50.1 Rotor Beckman)。各種不同之病毒顆粒由管底分層收集之。供免疫擴散法用。病毒之感染率以試管細胞測定之。感染率最高者供免疫擴散試驗。

免疫擴散試驗：免疫擴散試驗參照 Ouchterlony 法 (8) 但以 agarose 代替 agar。以 Agar gel buffer 0.15M 含 NaCl 及 0.05% Sodium azide 泡製成 0.65% 之 agarose，然後盛於培養平皿內。待凝固後以鑽孔器打洞。將純化之抗原與天竺鼠高度免疫血清分別滴入洞中，後置於室溫，每天檢查沉澱結果直至 7 天為止。

## 試驗結果

### 1. 交叉中和試驗

三種不同豬水疱病毒 (UKG 27/72, HK71 及 Italy/66)，以及二種 CB5 病毒 (Faulkner prototype 及最近分離毒 1401-72)，和它們的天竺鼠抗血清以及 Pool E 馬抗血清 (抗 Faulkner CB5 毒及其他人類之腸內病毒)。利用病毒灶抑制測定法，測定這些病毒間抗原性之關係，交叉中和試驗之結果係由重覆 2 次試驗的結果，取其平均值而來。其標準誤差值小於 ±0.20，其結果詳見表一。

經統計學方法分析後，抗 UKG 27/72 之血清對它同類病毒 (UKG/27/72) 中和能力遠較對 HK71; Italy/66 或 2 種 CB5 病毒強。雖然抗 HK71 之天竺鼠抗血清可以區別 HK71 及 Italy/66 豬水疱病毒和 2 種 CB5 病毒，但無法區別 HK71 及 UKG 27/72。抗 Italy/66 血清對 Italy/66; UKG 27/72 和 HK71 豬水疱病毒和最近分離之 CB5 (1401-72) 毒之中和力價雖然不同但與 Faulkner prototype CB5 毒則相似。抗 Faulkner prototype CB5 毒之天竺鼠血清對 Italy/66 及它的同類毒之中和力價相似。但對 UKG 27/72 及 HK71 則較小而對最近分離之 CB5 (1401-72) 則更弱。抗 CB5 (1401-72) 毒之天竺鼠血清可以區別豬水疱病毒與 CB5 病毒，但無法區別 2 種 CB5 毒。Pool E 馬血清 (抗 Faulkner prototype CB5 病毒) 對 Faulkner Prototype 之中和力價遠較對其他 CB5 毒及豬水疱病毒強。

換句話說上述結果表示在豬水疱病毒中，UKG 27/72 和 HK71 之抗原性稍異，此二種病毒與 Italy/66 顯然不同。最近分離之 CB5 (1401-72) 毒株與 Faulkner prototype 之抗原性顯然地不同。很有趣的，Faulkner prototype CB5 之抗原性比較接近豬水疱病毒，特別是 Italy/66 分離

株，而與最近分離之 CB5 (1401-72) 毒反而差異較大。

## 2. 免疫擴散試驗結果

如圖 1A 及圖 2A 所示，天竺鼠抗 UKG 27/72 豬水疱病毒血清在 UKG 27/72 及 HK71 病毒之間形成一特异性距 (Specific spur)，在 2 種豬水疱病毒及 2 種 CB5 病毒之間亦同。圖 1 1B 及圖 2 2A 指出天竺鼠抗 HK71 毒血清可以對 2 種豬水疱病毒與 2 種 CB5 毒加以區別，但無法區別同類中之 2 種豬水疱病毒即 UKG 27/72 及 HK71。類似之結果亦可見於圖 1 C 圖 2 2B，抗最近分離之 CB5 (1401-72) 病毒血清可以對 2 種豬水疱病毒及 2 種 CB5 毒加以區別，但無法區別同類中之 CB5 毒 (即 Faulkner prototype 及 1401-72 分離毒)。如圖 1 D 所示，天竺鼠抗 Faulkner prototype 血清可以在 Faulkner prototype 及 1401-72 CB5 毒之間形成特异性距，同樣也在 CB5 及 2 種豬水疱病毒之間形成此特异性距。

免疫擴散試驗結果與交叉中和試驗之結果相符合，各種 SVD 及 CB5 病毒之抗原性，可以用免疫擴散法來區別，但其不同之程度則無法以免疫擴散法顯示出。

## 討 論

由交叉中和試驗及免疫擴散試驗證明出 SVD 與 CB5 病毒之抗原性非常類似，但仍然可以區別。很重要地知道，最近分離 (1972 年) 之 CB5 病毒與 1952 年分離之 Faulkner prototype CB5 病毒之抗原性差異甚大。此與 Brown 等 (3) 之試驗結果相吻合。各種 SVD 分離病毒間之抗原性亦有差別，能以本試驗方法來區別之。Harris 等 (5) 指出 CB5 及 SVD 病毒之蛋白質組成成分之不同可以用膠體電泳法探測之。交叉中和試驗證明 Faulkner prototype CB5 毒之抗原性比較接近於 SVD 病毒，對同類之最近分離 CB5 (1401-72) 病毒反而差異較大。由此可推測，如 SVD 病毒是由 CB5 毒演變而來，則由 Faulkner prototype 而來可能性較大。而這二種 CB5 病毒抗原性之差異可能由於長期繼代於試管內發生變異之故。

從疫情學的觀點來看，SVD 病毒 UKG 27/72, Italy/66 及 HK71 抗原性之不同，可以假設在歐洲及亞洲所發生 SVD 之病原來源可能有所不同。

表 一 Cross neutralization test with SVDV and Coxsackie Virus B5 determined by plaque reduction test

Serum/Virus	Log virus plaque reduction by diluted serum*				
	SVDV			CB5	
	UKG27/72	HK71	Italy/66	Faulkner strain	Recent isolate (1401)
UKG27/72 Guinea pig**	3.89	3.30	3.19	3.05	2.47
HK71 Guinea pig	3.24	3.62	2.86	2.83	2.33
Italy/66 Guinea pig	1.79	2.03	2.61	2.30	2.11
Faulkner strain Guinea pig	1.78	1.64	2.15	2.37	1.20
Recent isolate (1401) Guinea pig	0.80	0.64	1.44	1.87	2.27
Pool E Horse serum***	3.51	3.42	3.34	4.98	3.26

\*Results expressed as the log reciprocal of serum dilutions which reduced 70% of the number of plaques of the test virus. The values present in the table represent means of two separate assays, standard error between two tests was less than 0.20.

\*\*All guinea pig serum used were at a dilution of 1/100.

\*\*\*Horse serum against CB5 (Faulkner) and other human enteroviruses was used at a dilution of 1/50.

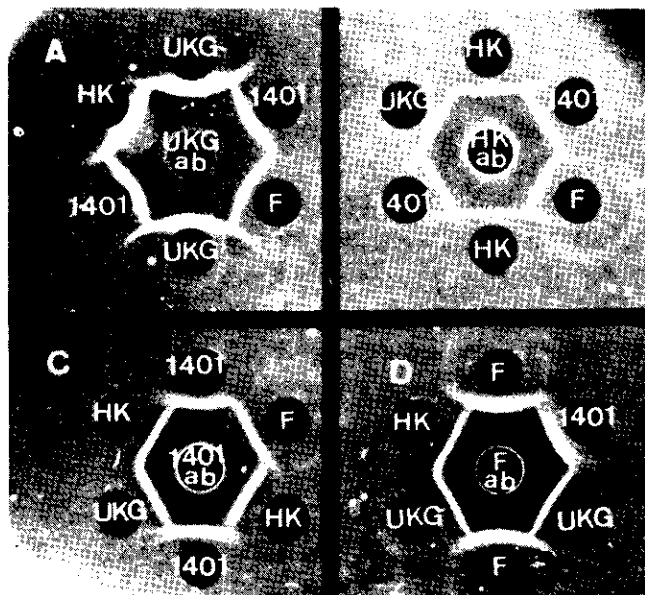


圖 一 Immunodiffusion test of 4 isolates of SVDV and CB5. Antigens are in the peripheral wells, guinea pig antiserum in the central wells. SVDV ; UKG, HK. CB5 ; 1401 (recent isolate) , F Faulkner strain.

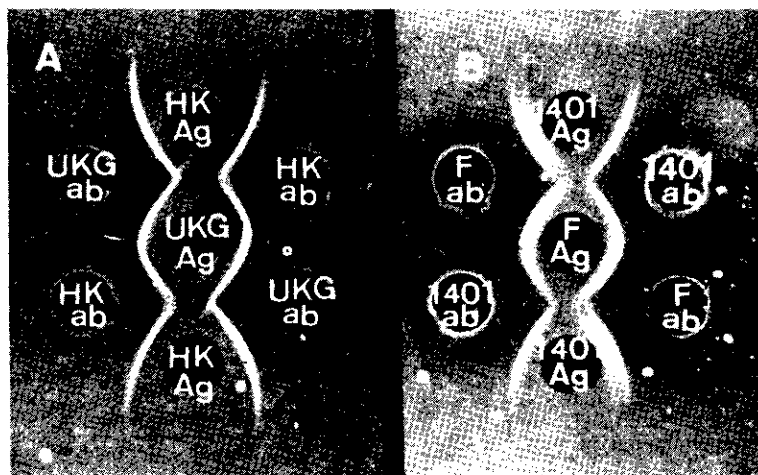


圖 二 Immunodiffusion test of 4 isolates of SVDV and CB5. A, SVDV ; UKG and HK. B. CB5V ; 1401 (recent isolate) and F Faulkner strain. Ag : antigens. ab : guinea pig antiserum.

## 参 考 文 献

1. Brooksby, J. B. (1975) . Swine vesicular disease : history of the disease. The Veterinary Record 95, 108.
2. Brown, F., Talbot, P. & Burrows, R. (1973) . Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to Coxsackie B5 virus. Nature, London 245, 315-316.
3. Brown, F. & wild, F. (1974) . Variation in the Coxsackie virus type 5 and its possible role in the etiology of swine vesicular disease. Intervirology 3, 125-128.
4. Graves, J. H. (1973) . Serology relationship of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus. Nature, London 245, 314.
5. Harris, T. J. R. & Brown, F. (1975) . Correlation of polypeptide composition with antigenic variation in the swine vesicular disease and Coxsackie B5 virus. Nature, London 258, 758-760.
6. Mowat, G. N., Darbyshire, J. H. & Huntley, J. F. (1972) : Differentiation of a vesicular disease of pigs in Hong Kong from foot-and-mouth disease. Veterinary Record 90, 618-621.
7. Nardelli, L., Lodetti, E., Gualandi, G. L., Burrows, R., Goodridge, D., Brown, F. & Cartwright, B. (1968) . A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. Nature, London 219, 1275-1276.
8. OUCHTERLONY, O. (1948) . Antigen-antibody reactions in gels. Arkiv for kemi, mineralogi och geologi 26B, 1-9.

## Antigenic Differences Between Swine Vesicular Disease Viruses and Coxsackie B5 Virus Isolates

Shiow-Suey Lai, P. D. Mckercher\*, D. M. Moore\*, J. H. Gillespie\*\*

\* Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island,  
N. Y. USA

\*\* Cornell University, Ithaca, N. Y. , USA

### Summary

The antigenic differences between the SVDV and CB5 isolates can be distinguished by neutralization and immunodiffusion tests despite their close relationship. Among SVDV isolates, UKG27/72 and HK71 showed slightly antigenic differences, however, were evident with Italy/66. The antigenic differences between Faulkner prototype and recent isolates of CB5 were also demonstrable. The Faulkner prototype was more closely related to the SVDV isolates, particularly to the Italy/66 than the recent CB5 isolate as evident by the plaque reduction test.