

# 臺灣禽痘病毒之分離與其性狀及 抗原性之研究

黃智明 鍾明華 詹益波 呂榮修

(臺灣省家畜衛生試驗所)

## 一、緒 言

禽痘被發現的歷史已很久遠，但是，引起本病的原因却始終未有定論。直到本世紀初 (1902) Marx 和 Sticker 兩氏首先發現其病原乃為濾過性病毒之後，才確定禽痘病毒 (Avian Poxviruses) 是引起本病的病原。其後，由於在各種家禽，野生鳥類陸續發現有禽痘之發生，因此有興趣的研究者對於各種禽類痘毒間之異同，加以研究並深入探討，掀起了許多議論。Beach<sup>3</sup>，Van Rooyen<sup>16</sup>等將禽痘病毒依其不同宿主而區分為雞痘毒 (Fowl Poxviruses)，火雞痘毒 (Turkey Poxviruses)，金絲雀痘毒 (Canary Poxviruses) 以及鴿痘毒 (Pigeon Poxviruses) 等四種，其間抗原不同，分別引起共同類宿主之痘瘡。

在臺灣，禽痘之為害家禽業者甚鉅，尤在蛋雞業者及火雞業者為甚。雖然一般普遍使用疫苗以預防本病之侵襲，但仍然有廣泛之發生，尤其是幼弱火雞，除非有完善的防蚊設備，否則即使應用疫苗免疫，亦無可倖免。是否所使用之疫苗乃以鴿痘中間毒為其種株之原故？誠不可知。因此為究明雞痘毒與火雞痘毒間之抗原性有否相異之處而其病原性是否相同，乃為本研究之主要目的。

## 二、試驗材料與方法

種雞蛋：本研究所使用者為本所無特定病原 (SPF) 動物中心及由與本所訂有合約之雞場供應。無抗體小雞：上述種蛋所孵化者，供為雞腎細胞組織培養，免疫血清製備及感染試驗等之用。

火雞：由民間購入，但無禽痘疫苗免疫過之母雞所產。

病毒分離方法：患有禽痘症狀之雞，火雞、鴿、金絲雀、麻雀等人工飼養或野生禽類之痘瘡，無菌操作取下後，以添加抗生素之組織培養維持液 (Maintenance, Medium MM) 作成 5~10 倍乳劑，遠心上清接種於 10~11 日齡之 SPF 雞胚絨毛尿囊膜 (CAM) 上，石臘密封後，孵於 37°C 之溫箱中，4~5 天後，剖蛋觀察 CAM 上之病灶，即 Pock 之形成。

病毒之繼代：剪取上述有 Pock 形成之 CAM，同法接種與觀察，而形成 Pock 之 CAM 即成次代繼代之接種材料。

病毒之純化：利用 Pock Picking Method 純化病毒，亦即在有禽痘病灶之 CAM 上，選取一明顯孤立單一之 Pock，以 MM 做成乳劑，遠心分離，取其上清液 0.1ml 接種於 10~11 日齡雞胚胎蛋之 CAM 上，4~5 日後，在 CAM 上形成之 Pock 病灶，即認為純粹之病毒。

抗原之製備：將上述各純化病毒之乳劑，接種於大量 10~11 日齡雞胚胎蛋之 CAM 上，孵於 37°C，每日觀察其生死，4~5 日後，活存者以無菌操作採取 CAM 上形成 Pock 病灶之部位，依照 Tsubahara 等<sup>15</sup> 之方法製成抗原，分裝於小試管，保存於 -20°C 冷凍冰櫃中，供為本研究之 Stock antigens。

免疫血清之製備：應用上述 Stock antigens 依照 Tripathy 等<sup>14</sup> 之方法，稍加改變，即以粗製抗原代替其精製抗原，作成免疫血清，分裝於小試管，存於 -20°C 冷凍冰櫃，供為本研究之 Stock

antisera。

病毒之乙醚感受性試驗：原則依照 Andrewes 等<sup>1</sup> 之方法處理病毒，即在病毒液中加入 20% Ethyl Ether，另以加入 MM 者為對照，兩者以橡皮塞密封後，置 4°C 冰箱 20 小時，翌日，經乙醚處理者傾入滅菌 Petri Dish 中使乙醚蒸發後，連同對照，分別作成 10 倍稀釋列，滴定於 10~11 日齡雞胚胎 CAM，4~5 後，檢查 CAM 病變，依 Reed & Muench<sup>10</sup> 的方法計算其 EID<sub>50</sub>。

病毒之熱抵抗性試驗：病毒液置 56°C 之水鍋中 30 分鐘，再以 10~11 日齡雞胚胎蛋滴定，另以無處理者為對照。病毒之雞腎胞組織培養：依 Youngner<sup>18</sup> 之方法製備雞腎細胞 (CKC) 組織培養，待其單層形成之後，抽棄培養液，接種 0.2ml 之病毒液，並使其均勻分佈於細胞單層表面，孵於 37°C 溫箱中使病毒吸着 2 小時，其間每 1 小時重新擴散病毒液一次。2 小時後加 MM 5ml，然後孵於 37°C 溫箱，每日觀察單層細胞之變化，於接種後第 5 日抽取培養液繼代於新鮮之 CKC，直至發現細胞病理變化 (CPE) 為止。

病毒核酸種類之判別：上述引起雞腎細胞 CPE 之繼代病毒 0.2ml 接種於 4 瓶新鮮 CKC 單層，在 37°C 溫箱吸着 2 小時後，抽棄接種液並以 Earles Solution 洗滌 2 次，其中 2 瓶添加含有 50r/ml 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) 之 MM，另 2 瓶為對照僅添加普通 MM，兩者孵於 37°C 溫箱，5 日後取出，以 10~11 日齡雞胚胎蛋滴定。

病毒封入體之檢查：剪取患禽之痘瘡部依 Sevoian<sup>12</sup> 之方法觀察其封入體。

病毒之交叉瓊脂沈降反應：依照 Tsubahara 等<sup>15</sup> 之方法實施。

病毒之交叉感染及防禦試驗：8 隻材料雞分為 A.B.C.D. 四組，每組 2 隻，另 8 隻火雞亦為 E.F.G.H. 四組；其中 A.B.E.F. 四組以 Follicle method 接種雞痘毒淡水一 1 株，其餘四組則接種火雞痘毒三芝株，然後觀察發痘情形，待發痘消失後，A.C.E.G. 四組次雞痘毒淡水一 1 株攻擊之，而 B.D.F.H. 四組則以火雞痘毒三芝株攻擊之，繼續觀察紀錄其發痘情形。

### 三、試驗結果

病毒分離：利用 10~11 日齡 SPF 雞胚胎蛋，曾由雞、火雞、鴿、金絲雀、麻雀等家禽或野生鳥類分離得 9 株痘毒：即由雞分離 3 株 (淡水一 1，淡水一 2 及關渡株)；由火雞分離 2 株 (三芝，高雄株)；由鴿分離 2 株 (淡水一 1、淡水一 2 株)；由金絲雀分離 1 株及由麻雀分離 1 株。

病毒繼代：上述諸分離毒復以 10~11 日齡 SPF 雞胚胎蛋代通過，計雞痘淡水一 1 株 5 代，淡水一 2 株 4 代，關渡株 7 代；火雞痘毒三芝株 7 代，高雄株 6 代；鴿痘毒淡水一 1 株 3 代，淡水一 2 株 4 代；金絲雀痘毒 5 代；麻雀痘毒 9 代。所有病毒之每一代均引起雞胚胎絨及尿囊膜產生禽痘毒之特徵病灶，亦即 Pock 形成，肥厚，水腫 (相片 1，表 1)。但有逐漸減弱之趨勢。

病毒對乙醚，熱，IUDR 之感受性試驗：分離毒雞痘淡水一 1 株，火雞痘三芝株及鴿痘淡水一 1 株對 20% Ethyl Ether，熱，及 IUDR 之感受性試驗羣與對照羣之成績如表 2 所示，得知所有株試驗株對 20% Ethyl Ether 均有抵抗性；對 56°C，30 分則除鴿痘毒稍有抵抗外，其餘二株均具感受性而被不活化；至於 IUDR 之感受性，則由 3 株全部被不活化而獲悉其構成核酸均為 DNA。

表 1 分離病毒在雞胚胎之生長

Virus Strain	Growth on CAM	Appearance of Pock
Chicken Pox 淡水-1	+	Small, White, Opaque
Turkey Pox 三芝	++	Large, White, Opaque
Pigeon Pox 淡水-1	++	Large, White, Opaque

病毒之鷄腎細胞組織培養：以盲目繼代方式將分離毒鷄痘淡水—1株，火鷄痘三芝及鴿痘淡水—1株等累代通過於CKC，結果3株均於第4代時開始在CKC上引起圓化細胞之CPE。

表 2 分離毒20% Ethyl Ether, 56°C, 30' 及 IUDR 之感受性

Virus Strain	20% Ethyl Ether	56°C, 30'	IUDR
Chicken Pox 淡水—1	0.5*	3.0	3.5
Turkey Pox 三 芝	0.5	4.0	3.5
Pigeon Pox 淡水—1	1.0	1.5	3.0

\*數字表示試驗羣與對照羣 EID<sub>50</sub> 對數差

病毒之瓊脂沈降反應：除了對照之新城鷄瘟病毒 La Sota 株之抗原抗體間有模糊之沈降線外，其餘試驗毒株之抗原抗體間未見沈降線之出現，是否免疫血清中抗體力價太低？抑或其他原因，擬予查究。

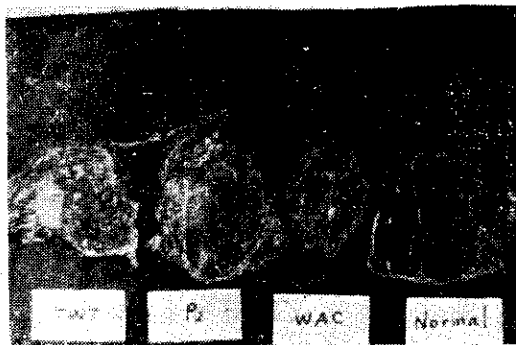
病毒之交叉感染及防禦試驗：

表 3 分離病毒之交叉感染及防禦試驗

禽 別	鷄								火 鷄								
	禽 號	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
組 別	A		B		C		D		E		F		G		H		
接 種 毒	鷄痘毒				火鷄痘毒				鷄痘毒				火鷄痘毒				
鷄 痘	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
攻 擊 毒	鷄痘毒		火鷄痘毒		鷄痘毒		火鷄痘毒		鷄痘毒		火鷄痘毒		鷄痘毒		火鷄痘毒		
發 痘	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

由表 3 成績所示得悉，無論鷄痘毒或火鷄痘毒對其同類宿主及異類宿主均可感染而使其發痘，而在接種後再以鷄痘毒或火鷄痘毒攻擊時，所有試驗之16隻鷄及火鷄均未具再發痘，顯示鷄痘毒和火鷄痘毒對同類及異類宿主均具免疫效果，甚至可抵抗異類病毒之攻擊，若此觀之，鷄痘毒與火鷄痘毒之具有共通抗原，似可斷言。

病毒封入體之觀察：痘瘡（相片 2、3）依 Sevoian<sup>12</sup> 之方法固定。包埋、切片、染色後，在顯微鏡下觀察，可見嗜伊紅性封入體佔據上皮細胞之細胞質大部份，而紫紅色之細胞核則被壓迫於細胞之一角（相片 4）



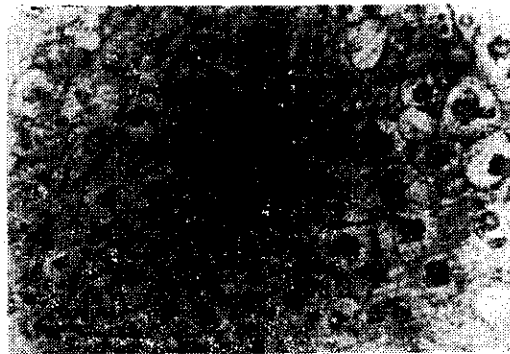
相片 1 禽痘毒引起 CAM 之 Pock



相片 2 鷄之痘瘡



相片 3 火鷄之痘瘡



相片 4 禽痘毒之封入體

#### 四、討 論

禽痘之侵犯多種禽鳥類，前入已有許多報告，而筆者亦曾在本省由鷄、火鷄、鵠、金絲雀、麻雀等人工飼育及野生禽鳥分離到禽痘病毒。諸分離毒之生長及生化特性：諸如在 CAM 上發育並形成 Pock、乙醚抵抗力，熱感受性、DNA 病毒，嗜伊紅性細胞質內封入體等，均能與前人<sup>4</sup>的結論相符，是證筆者所分離之諸病毒確屬禽痘病毒無誤。

Beach<sup>3</sup> 和 Rooyen<sup>16</sup> 主張禽痘病毒應依其宿主來分類，同時認為各類禽痘病毒間具有不同的病原性與抗原性，但是，Brunett<sup>6</sup> 在研究鷄痘毒和火鷄痘毒之免疫學與病原學之關係後，宣稱除了鷄痘毒之病程較火鷄痘毒為長以外，兩者可說毫無相異之處，根據 Brandly & Dunlap<sup>5</sup> 之報告，Brunett 的結論愈見穩固；而 Cunningham<sup>7</sup> 則持較為中庸的說法，雖然他認為鷄痘毒與火鷄痘毒是一樣的，但是如果不一依其宿主來源則很難有適當的分類，因為有些禽痘毒是單病原性或雙病原性，甚或三病原性。筆者此次所分離自鷄及火鷄的痘毒，若依交叉感染及防禦試驗和 Pock 形成情形來看，結果是與 Brunett 的觀點相接近，不過以其病性的強弱稍有出入而已。

自從 Bang 等<sup>2</sup>報告以鷄胚胎纖維芽細胞 (CEFC) 組織培養禽痘病毒以後，許多研究者<sup>8-9, 11-13-17</sup> 都曾嘗試禽痘病毒的組織培養。筆者為進行本研究，亦曾嘗試禽痘病毒的鷄腎細胞組織培養，結果令人滿意，有些分離毒在盲目繼代 (Blind Passage) 至第 4 代時即開始有 CPE 之出現，比 Yoshida<sup>17</sup> 之第 13 代提早 9 代之多。

## 五、結 語

1. 在本省之經濟禽類（鷄、火鷄），玩賞禽類（鴿、金絲雀），以及野生鳥類（麻雀）等都曾發現禽痘之感染，並分離得病毒。

2. 分離禽痘病毒在鷄胚胎CAM上形成或大或小之不透明白色 Pock；對 20% 乙醚具有抵抗力；對熱有感受性（在 56°C，30 分鐘被不活化）；構成核酸為 DNA；；在上皮細胞之細胞質內形成嗜伊紅性之橢圓形封入體。

3. 分離毒中，鷄來源與火鷄來源之痘毒，除其起病性有強弱程度之差外，具有一樣的病原性及共通之抗原性。

## 誌 謝

本研究之完成承蒙行政院國家科學委員會之補助並蒙本所陳所長守仕及林博士再春之指導與鼓勵，謹誌衷心之謝忱。

## 六、參考文獻

1. Andrewes, C.H., and Horstmann, D.M. (1949) : The Susceptibility of Virus to Ethyl Ether. *J. Gen. Microbiol.*, 3, 290—297.
2. Bang, F.B., Levy, E. and Gey, G.O. : (1951) : Some Observation on Host—Cell—Virus Relationship in Fowl Pox. *J. Immunol.*, 66, 329—345.
3. Beach, J.R. (1939) : Report of Committee on Poultry Disease. *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 95, 613.
4. Bell, T.M. (1967) : The Poxviruses. in *An Introduction to General Virology*. Imperial Cancer Research Fund, E.A. Virus Research Institute. 170—188.
5. Brandly, C.A. and Dunlap, G.L. (1939) : Studies on Certain Filtrable Viruses. II. Immunization against Fowl Pox with Fowl—and Pigeon—Viruses Cultivated in Vivo and in Vitro. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 95, 340.
6. Brunette, E.L. (1934) : Some Observation on Pox Virus Obtained from Turkey. *Rep. N.Y. St. Vet. Coll.* P69.
7. Cunningham, C.H. (1959) : Fowl Pox. in *Disease of Poultry*. 4th ed. ed. by Biester, H. E. and Schwarte, L.H. The Iowa State Univ. Press. 575—598.
8. Doyle, T.M., Dobson, N. and Martin, R. (1962) : Fowl Pox Tissue Culture Vaccine. *Vet. Rec.* 75, 359—361.
9. Kangude, G.M. and Hanson, L.E. (1962) : Tissue Culture Propagation of Fowl Pox Virus in Primary Cultures of Chicken Embryo Cells. *J. Vet. Res. Mhow*, 6, 1—18.
10. Reed, L.T. and H. Muench. (1938) : A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent End Point. *Am. J. Hyg.* 27, 493—497.
11. Sato, T., Sugimori, T. and Matumoto, M. (1962) : Propagation of Canary Pox Virus in Monolayer Culture of Chick Embryo Cells. *Jap. J. Vet. Sci.* 22, 463.
12. Sevoian, M. (1960) : A Quick Method for the Diagnosis of Avian Pox and Infectious Laryngotracheitis. *Avian Diseases.* 4, 474—477.

13. Sugimori, T., Sato, T., Shimizu, T. and Matumoto, M. (1960) : Fowl Pox Virus Isolated During Cultivation of Chick Embryo Cells. *Jap. J. Vet. Sci.* 22, 463.
14. Tripathy, D.N. (1970) : Passive Hemagglutination Test with Fowl Pox Virus. *Avian Diseases*. 14, 29—38.
15. Tsubahara, H. and Kato, K. (1961) : Application of Agar Gel Precipitin Test to Bird Pox Viruses. *Bull. N.I.A.H.* 41, 43—54.
16. van Rooyen, C.E. (1954) : A Revision of Holmes's Classification of Animal Viruses. *Canad. Jour. Microbiol.* 1, 227.
17. Yoshida, I. (1965) : Propagation of Pigeon Pox Virus in Monolayer Culture of Pigeon Kidney Cells. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 5, 173—182.
18. Youngner, J.S. (1954) : Monolayer Cultures. I. Preparation and Standardiation of Suspensions of Trypsin—Dispersed Monkey Kidney Cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85, 202—205.

## Studies on the Isolation, Characterization and Antigenicity of Avian Poxviruses in Taiwan

C. M. Huang; M. H. Jong; I. P. Chan; Y. S. Lu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

### English Summary

1. Nine isolates of avian Poxviruses have been isolated from chickens, turkeys, pigeons, canaries and sparrows in Taiwan.
2. Some properties of the isolates were determined :
  - 1) They grow well and produce pocks on the CAM of fertile hens' eggs.
  - 2) They are resistant to ether.
  - 3) They are inactivated at 56°C for 30 minutes.
  - 4) They consist of DNA.
  - 5) They form eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies in the epithelial cells.
3. In addition to Variance in virulent, the chicken Poxvirus and the turkey Poxvirus possess a common antigen and pathogenicity.