

豬瘟疫苗毒與野外毒抗原性之差異

潘居祥 鍾明華 黃金城 黃天祥 楊喜金 李淑慧 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

本試驗係從病毒性狀及胺基酸序列差異上，探討豬瘟疫苗毒與野外毒兩者抗原性之差異。從豬瘟病毒七種不同的限制酶圖譜中選取 36 株野外分離毒，採用新城病毒增強法 (END) 及 E⁻干涉法測定病毒性狀。結果出現 34 株以 END 法呈陽性屬於強毒株，2 株以 E⁻干涉法呈陽性屬於弱毒株。應用病毒斑點性狀測定法 (IIPS)，依病毒斑灶大小可清楚區別 LPC 疫苗毒及 ALD 強毒株所產生之病毒斑灶，但不同野外毒病毒斑灶則出現大小不一的現象。另將 LPC 疫苗毒及 ALD 強毒株病毒核酸中，與中和抗體產生有關的 E0、E1 及 E2 糖蛋白基因 (2,235 bp) 進行核酸定序，並將核酸序列轉譯成胺基酸序列，共可轉換成 745 個胺基酸。比較兩者胺基酸總體相似性高達 94.7 %，但在胺基酸序列 471 及 480 之間大約在 E2 糖蛋白 B domain 位置出現高度變異，此區間 10 個胺基酸序列中即出現高達 6 個相異的胺基酸序列。

關鍵詞：豬瘟病毒、新城病毒增強法、E⁻干涉法、間接免疫酵素標幟染色法、核酸定序

緒言

由於豬瘟病毒對各種品系和各階段年齡的豬隻都會感染，很難依毒性不同作毒株的分類，一般常依豬隻感染豬瘟後，臨床上呈現的各種嚴重程度及病程的長短，將豬瘟病毒的毒力區分成：強毒株、中間毒株和弱毒株。此三種病毒株與 LPC 疫苗毒之間抗原性差異有多大？現行 LPC 疫苗種毒已經使用 30 多年，LPC 疫苗毒對於各種豬瘟野外毒變異株能否具有完全保護效力則缺乏文獻資料。因此有必要探討豬瘟疫苗毒與野外毒兩者間抗原性之差異，並評估目前使用之 LPC 疫苗毒對於不同豬瘟野外毒之免疫效力，以做為 LPC 疫苗改良及豬瘟防疫之依據。

目前從病毒的分子生物學上很難區別豬瘟病毒的毒性強弱，有學者以豬瘟病毒在試管內的培養特性來區別毒株的強弱。據 Van Oirschot [16] 的說法，豬瘟強毒株的理想培養溫度是 39~40 C，弱毒株為 33~34 C，而中間毒株則介於強毒株和弱毒株之間為 35~38 C，強毒株的豬瘟病毒在 PK-15 細胞上的增殖速度較其它兩者來的快且力價高，以免疫螢光抗體染色法區別也發現強毒株的螢光較強且病灶較大 [7]。此外，強毒株在 56 C 溫度下的耐受性也較弱毒株和中間毒株強。Pirtle 和

Mengeling [12]將分離自慢性豬瘟病例的病毒和抗強毒株的免疫血清進行中和試驗，結果發現病毒對自家血清的中和反應效力較不同源血清的反應來得高，這表示強毒株與弱毒株之間的抗原性有所不同。所以 Van Oirschot [16] 依血清中和試驗的結果將豬瘟病毒分類為兩種亞群 (subgroup)，第一種亞群是包含了豬瘟強毒株和已馴化的疫苗毒株，而第二種亞群是豬瘟弱毒株和中間毒株，其中以第二種亞群毒性較弱的豬瘟病毒在血清學上和牛的 BVD 病毒的關係較相近。潘 [1] 應用反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 及限制酶片段多形性 (RFLP) 兩種技術已可將豬瘟野外毒區分為 5 種不同毒株。在病毒特性方面，豬瘟病毒以組織培養細胞在試管 (包括培養盤) 中之毒性，可測得三種性狀，即以 END 法測出陽性者為強毒病毒，以 E⁻ 干涉法測出陽性者屬 GPE⁻ 型弱毒性病毒，而以 E⁻ 二段法測出陽性病毒，係屬兔化豬瘟毒型病毒。顯示可利用此三種方法檢測野外分離毒 [2]。

豬瘟病毒基因具有一個開放讀碼區 (Open reading frame; ORF) [8]，其 3'端不具 poly-A Tail，5' 端和 3' 端各有一段非轉譯區 5'-UTR 與 3'-UTR。豬瘟病毒基因在開放讀碼區轉譯出一段 3,898 個譯碼 (codons) 之多胜 (polypeptide)，此為病毒蛋白質前驅物 (precursor protein)，在經過病毒或宿主的酵素切割作用後才會形成成熟的病毒結構性蛋白 [14] [17]。

豬瘟病毒結構性蛋白主要包含有 nucleocapsid protein (p14) 及三種 gp44/48 (E0)、gp33 (E1)、gp55 (E2) 之封套蛋白 (envelop glycoprotein) [4]，其中以 gp55 (E2) 研究最多也最早被定位，gp55 含有豬瘟病毒主要抗原決定基 (epitope)，亦為中和抗體產生之主要蛋白 [9] [19]，其文獻上記載病毒封套蛋白與抗原性最具有相關性。本試驗即藉由核酸定序及胺基酸轉譯之方法，嘗試從病毒封套蛋白胺基酸之序列差異上瞭解豬瘟強毒株 (ALD) 與兔化豬瘟疫苗毒 (LPC) 兩者在抗原性上之差異。

材料與方法

一、病毒來源

1. ALD 豬瘟強毒株：本株病毒用豬隻繼代保存，以發病豬之脫纖血作為病毒來源。
2. LPC 兔化豬瘟疫苗株：本試驗使用者為經家兔繼代第 824 代之病毒，為本所供疫苗製造用之種毒。
3. A76 豬瘟病毒株：由日本家畜衛生試驗場分讓，以豬睪丸初代細胞增殖 4 天後凍結，經二次冷凍解凍後保存。
4. P97 豬瘟強毒株：由台大獸醫系賴秀穗教授分讓。
5. 豬瘟病毒野外分離株：由全省各地採集及各縣市家畜疾病防治所送檢之豬瘟病例檢體，取脾臟、腸間淋巴節、扁桃腺等組織臟器以 MEM 培養液作成 10 倍乳劑，經 1000 xg 4 C 離心 20 分鐘後，取上清液分裝備用。
6. GPE⁻ 株：供 E⁻ 干涉法及 E⁻ 二段干涉法使用之 GPE⁻ 弱毒株，為日本農林水產省家

畜衛生試驗場所開發，用為豬瘟活性弱毒疫苗製造用之毒株。

7. 西部馬腦脊髓炎病毒 (WEE)：本病毒經小白鼠腦繼代 12 代，然後經雞胚胎細胞繼代 4 代之病毒，病毒液分裝於小試管，於 -80 C 保存。
8. 新城病病毒：供 END 法試驗之宮寺株毒，係 1961 年川島等，從自然感染雞之病材接種於雞胚胎所分離。

二、END 法 (Exaltation of newcastle disease)

依據 Kumagai 等 [5] 之標準所試驗。被檢豬瘟病毒經 1:10 稀釋後，各稀釋階段病毒液接種於 4-8 支小試管，每支試管接種 0.1 ml，然後每支小試管再接種 0.4 ml 細胞懸浮液並充分混合，置 37 C 靜置培養 5 日後，抽棄培養液，各試管分注 $10^{6.0}$ PFU/ml 倍數之新城雞瘟病毒培養液 0.5 ml 攻毒，置 37 C 迴轉培養 3 日，以顯微鏡檢查有無 CPE 供為判定，結果 CPE 陽性時被檢病毒則為陽性。

三、E⁻干涉法

依據 Shimizu 等 [13] 以豬瘟弱毒 GPE⁻株干涉定量法之標準試驗。即被檢豬瘟病毒經 1:10 稀釋後，各稀釋階段病毒液，接種於 4-8 支小試管，每支試管接種 0.1 ml，然後每支小試管再分注 0.4 ml 細胞懸浮液並充分混合，置 37 C 靜置培養 5 日後，抽棄培養液，各試管分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之西部馬腦脊髓炎病毒培養液 0.5 ml 攻毒，置 37 C 迴轉培養 3 日，以顯微鏡檢查有無 CPE 供為判定，結果 CPE 陰性時被檢病毒則為陽性。

四、E⁻二段干涉法

依據 Lin 及 Lai 等 [6] 之兔化豬瘟病毒 LPC-China 株定量法試驗。即為 LPC-China 株毒培養後，以同類 GPE⁻毒之干涉，再以 WEE 毒之二段干涉檢出法。試驗時被檢豬瘟病毒經 1:10 稀釋，各稀釋階段病毒液，接種 5 支小試管，每支試管接種 0.1 ml，然後每支小試管再分注 0.4 ml 細胞懸浮液並充分混合。置 37 C 培養 5 日後抽棄培養液，各試管分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之同類豬瘟弱毒 GPE⁻株病毒培養液 0.5 ml 干涉，置迴轉培養 3 日後抽棄培養液，每試管再分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之西部馬腦脊髓炎病毒之培養液 0.5 ml 攻毒，置 37 C 迴轉培養 3 日，以顯微鏡檢查有無 CPE 供為判定。結果如被檢病毒在接種豬精巢細胞發育增殖時，同類豬瘟 GPE⁻株病毒則被干涉不增殖，再以西部馬腦炎病毒攻毒時，LPC-China 株毒不被 WEE 病毒干涉，而呈 CPE 效果。反之如兔化豬瘟病毒陰性時，同類豬瘟 GPE⁻株病毒則不被干涉而發育增殖，然攻擊之西部馬腦脊髓炎病毒而被 GPE⁻株毒干涉，結果細胞不呈 CPE 效果。

五、間接免疫酵素標幟染色法 (IIPS) [11]

1. 將已形成單層細胞 3-5 天之豬腎臟株化細胞 (CPK) 以胰蛋白酶液消化下來後，以 1:4 面積培

- 養於 6 孔細胞培養盤並置於 37 C，5 % CO₂ 恆溫器內培養 2-3 天。
2. 等細胞長滿後，將細胞生長液甩掉，每孔加入 10 倍稀釋(10⁰-10⁻⁵)之病毒液 0.2 ml 於 37 C 感作 1 小時，感作期間每 10 分鐘搖動一次，以防止細胞乾燥。
 3. 吸掉病毒接種液，並於每孔加入 3 ml 的 1 % methyl-cellulose-MEM 置於 37 C，5 % CO₂ 恆溫器內培養 2-3 天。
 4. 三天後甩掉 methyl-cellulose-MEM 以 PBS 洗掉 methyl-cellulose-MEM 後，將培養盤細胞層於室溫中完全乾燥。
 5. 每孔加入 10 % 中性福馬林 1 ml 室溫中固定 10 分鐘後以 PBS 快洗 2 次，浸泡 1 次（浸泡 10 分鐘後棄 PBS）
 6. 加入 250 倍稀釋之豬瘟高度免疫血清(豬血清)，每孔 1 ml，於 37 C 感作 30 分鐘後以 PBS 快洗 2 次，浸泡一次，甩棄 PBS。
 7. 於每孔中加入 1 ml 稀釋之山羊抗 IgG 過氧酵素標示抗體 (caprine anti-swine IgG-horseradish peroxidase conjugate) 於室溫中感作 30 分鐘，以 PBS 洗 3 次，最後 1 次以 PBS 浸泡 10 分鐘，甩棄 PBS。
 8. 於每孔加入 0.4 ml 受質，直至斑點呈色後，甩棄受質，以自來水清洗，涼乾後觀察。受質：將 10 mg 之 3'3'-diaminobenzidin 溶於 10 ml PBS 含有 0.01 % H₂O₂。本受質呈色後，斑點為咖啡色。

六、病毒核酸之定序及胺基酸之轉譯

1. ALD 強毒株及 LPC 疫苗毒株基因片段選殖體

此二株為筆者先前已選殖成功之選殖體 [1]，此二選殖體為 pUC 19 質體（分讓自台大獸醫系）上分別插接 ALD 強毒株及 LPC 疫苗毒株之 cDNA 片段，長度為 2,235 bp。

2. 定序用引子

鑑於 Cycle Sequencing 定序法之執行結果，每次核酸定序反應平均可決定五百個核酸，因而為求得 2,235 bp，目標核酸片段之完整序列資料，便採行引子邁步模式，完成核酸定序工作，定序過程中所設計之引子如下：

(1) M13 universal primer：

5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'

(2) ANT-1 primer：sense (1522-1541 bp)

5'-GACATCAACGTGGTCACCCA-3'

(3) ANT-3 primer：sense (2014-2033 bp)

5'-TTCTGCTGCTCTCTCTGGTC-3'

(4) M13 reverse primer

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

(5) ANT-2 primer : antisense (2975-2994 bp)

5'-TCACACATGTCCAGTTGGCC-3'

(6) ANT-4 primer : antisense (2556-2537 bp)

5'-ACGGTCCCATCATCCAGTTG-3'

3. 進行 PCR 反應

(1) 刪選一個含有 insert DNA 之 pUC19 質體的大腸桿菌菌落至蒸餾水中，以 95 C 水浴 2 分鐘後，短暫快速離心。取上清液作為 PCR 反應之模版核酸，並配製 PCR 反應液。

(2) PCR 反應液置於 perkin-Elmer 9600 thermal cycler 後，先以 95 C 加熱 2 分鐘後再經 94 C 10 秒，55 C 60 秒，72 C 60 秒進行 35 個循環後，獲得 PCR 產物。

(3) 將 PCR 產物加入 8 μ l 3M NaOAc 及 20 μ l 40 % pEG-8000，置於室溫中 10 分鐘，再經 13,000 xg 10 分鐘沉澱 DNA 後，以 250 μ l 95 % 酒精洗 2 次。最後以 speed Vac 短暫乾燥，並溶於 20 μ l H₂O 中，以供進行 Termination cycle sequencing reaction 之用。

4. 進行 Termination cycle sequencing reaction

(1) 取上述溶於水中之 PCR 產物 10 μ l 作為模版核酸，應用 Dye Termination Cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer ABI Inc) 及上述引子進行 cycle sequencing reaction。

(2) 反應產物載入 ABI 377-18 核酸自動定序分析儀中進行電泳定序反應。

5. 核酸序列分析及胺基酸轉譯

經定序反應後，獲得多條豬瘟病毒核酸序列，利用 Navigator(PE ABI Inc) 軟體進行組合比對除錯，最後利用 LaserGene Sequence Analysis Software Package(DNA STAR Inc.) 之 EditSeq 程式將核酸序列轉換成胺基酸序列並進行比對分析。

結 果

一、豬瘟病毒性狀測定

豬瘟病毒之試管反應，計有新城病增強法 (Exaltation of newcastle disease s ; END) ，E⁻干涉法及 E⁻二段干涉法。END 法之檢測一般以強毒之 A76 豬瘟病毒為代表，E⁻干涉法通常為弱毒之 GP⁻ 為代表，而 E⁻二段干涉法則以兔化豬瘟毒為代表。從野外分離之豬瘟病毒中選出 36 株分別屬於 7 種不同限制酶圖譜的分離毒，採用 END 、E⁻干涉法及 E⁻二段干涉法測定病毒性狀。結果出現 34 株以 END 法呈陽性屬於強毒株，其中有 2 株以 E⁻干涉法呈陽性屬於弱毒株而兔化豬瘟病毒則以 E⁻二段干涉法呈陽性反應。

二、間接免疫酵素標幟染色法 (IIPS)

為瞭解從野外分離的豬瘟病毒株，能否從病毒斑灶大小來分辨毒性強弱因而將四種實驗室已知的豬瘟病毒株 ALD、A76、P97、LPC 及 6 種野外分離強毒株與 94-4 弱毒株共 11 株

豬瘟病毒。以間接免疫酵素標幟病毒斑灶染色法，染色觀察不同病毒之斑灶大小情形，結果如表一。ALD、P97、A76 病毒斑大小 0.54 mm 以上，LPC 大小約 0.28 mm，野外分離病毒除 3-130 強毒株外，其他均介於強毒株 (ALD、P97、A76) 與 LPC 之間，強毒株 > 野外分離毒 > LPC 疫苗株 (0.54 > 0.31 > 0.28)。由強毒株 ALD、P97、A76 等三株變方分析 (ANOVA)，實測 F 值 = 0.5225 < F(2, 27, 0.05) = 3.35，差異不顯著，即 ALD、P97、A76 等三株強毒株斑點大小相同無差別。由野外分離株 3-118、3-130、3-56、3-18、4-16、4-30 及 94-4 等 7 株分離株，實測 F 值 = 1.5853 < F(6, 70, 0.05) = 2.23，差異不顯著，即 7 株分離毒中 6 個強毒株與 94-4 弱毒株病毒斑大小無顯著差異。從 ALD 與 LPC 之值測試結果 T 值 = 12.81703 < T(18, 0.01) = 2.878 差異極顯著，顯示 ALD 與 LPC 病毒斑灶大小有極顯著差異。

三、病毒核酸定序及胺基酸轉譯

將分別含有 ALD 病毒核酸片段及兔化豬瘟疫苗毒核酸片段之質體與定序用之引子進行 PCR 反應後，以 PEG-8000 沈澱並純化 PCR 產物，再進行 Dye Deoxy Termination Cycle Sequencing Reaction。反應後之產物 loading 至 ABI 377-18 DNA Sequencer (ABI, Perkin Elmer) 上定序分析，經比對圖形整理資料後得到長度為 2,235 bp 含豬瘟病毒糖蛋白 E₀、E₁、E₂ 之核酸序列。利用核酸及胺基酸轉換軟體 (DNA STAR) 將核酸序列轉譯成胺基酸序列，共可轉換成 745 個胺基酸，將這二條胺基酸序列排列比對 (圖一)，發現 ALD 強毒株與兔化豬瘟疫苗毒株之胺基酸相似性極高，總體相似性高達 94.7%，但經詳細比對，在胺基酸序列 471 及 480 之間，在 10 個胺基酸序列中即出現高達 6 個相異的胺基酸序列。

表一 不同豬瘟病毒株病毒斑灶之大小

病毒株	N	X (μ)	SD	信賴限界 (μ)
ALD	10	5,400	520.2	5,400±372.1
LPC	10	2,824	365.7	2,824±261.6
P97	10	5,464	402.7	5,464±288.1
A76	10	5,616	23.6	5,616±374.6
3-18	10	3,208	446.9	3,208±319.7
3-118	10	3,064	463.5	3,064±331.5
3-130	10	2,720	510.2	2,720±364.9
3-56	10	3,248	545.5	3,248±390.2
4-16	10	3,344	649.7	3,344±464.7
4-30	10	3,032	474.7	3,032±339.6
94-4	10	3,064	425.1	3,064±304.1
7 株野外分離株	70	3,097	519.9	3,097±123.9

討 論

一、豬瘟病毒性狀測定

豬瘟病毒性狀測定法是早期檢測豬瘟強毒株、弱毒株及 LPC 疫苗株之實驗室檢測法，本試驗即藉由 END 法、E⁻干涉法及 E⁻二段干涉法等三種方法對 36 株分別屬於 7 種不同限制酶圖譜的豬瘟病毒進行豬瘟病毒性狀測定，結果出現 34 株以 END 法呈陽性。由於 END 法呈陽性者屬於豬瘟強毒株 [2]，從病歷資料中得知此 34 株豬瘟病毒皆屬強毒株。而 2 株以 E⁻干涉法呈陽性，由 E⁻干涉法陽性者屬弱毒株，再從病歷資料中得知此二株 (94-4, S-59) 在臨床上即呈現致病性不高的非典型豬瘟病例。而惟有 LPC 疫苗毒以 E⁻二段干涉法呈現陽性，由此結果可知，雖然豬瘟病毒只有一種血清型，但不同豬瘟病毒之間性狀亦有差異，必須藉由其它方法來瞭解其差異程度。

二、間接免疫酵素標幟染色法

Terpstra [15] 認為毒力強的豬瘟病毒，在豬體內散佈的速度較毒力弱的豬瘟病毒來得快。Pan [11] 則認為間接免疫酵素標幟染色法 (IIPS) 可用於檢出接種於組織培養細胞內之豬瘟病毒，而由病毒引起之斑灶大小可區別豬瘟強毒及 LPC 疫苗毒 [3]。為瞭解是否能從病毒斑灶大小來區別野外豬瘟分離毒的毒性強弱，因而進行 IIPS 試驗。由結果看出 ALD、A76 及 P97 三種病毒之病毒斑灶最大，LPC 最小。而從野外分離的病毒株，其病毒斑大小則介於 ALD 與 LPC 之間，而野外分離的強毒株與弱毒株之間病毒斑大小差異不顯著。推究其原因，可能是 A76 病毒已於細株化細胞內馴化多代，因而增加 A76 在細胞株內的增殖速度，所以出現較大病毒斑。而 P97 係在民國 81 年間分離到的野外毒，此病毒株在實驗室中係以 PK15 及 CPK 繼代保存多代，似乎亦有細胞馴化現象。至於野外分離的強毒株，皆未見有病毒斑大如 ALD 者，推測可能因野外毒係初次接觸株化細胞，尚未適應，故增殖速度無法像 ALD 之病毒斑一樣大。亦可能是野外分離之強毒株，其毒力比不上 ALD，而 ALD 病毒則屬超強毒。從各種病毒株病毒斑之大小，除了可以區別 ALD 及 LPC 外，似乎無法區別豬瘟野外分離株的毒力強弱，因此必須採用其他方法來區別豬瘟野外分離株的毒力強弱。

三、病毒核酸定序及胺基酸轉譯

瞭解病毒性狀差異另一種間接方法是從核酸定序及胺基酸轉譯來瞭解不同病毒株個別差異，本試驗即選定 ALD 豬瘟強毒株及 LPC 疫苗株結構蛋白中 E₀、E₁、E₂ 三種封套蛋白之基因位置進行核酸定序，共得到長度為 2,235 bp 之核酸序列，最後將其轉換成 745 個胺基酸序列。將 ALD 強毒株及 LPC 疫苗株之胺基酸序列排列比對，其總體相似性高達 94.7%，但高度變異區出現在胺基酸序列 471 至 480 間，即病毒引發中和抗體反應之 E₂ 醣蛋白 B domain 位置出現高度變異，在 10 個胺基酸序列中即出現高達 6 個相異的胺基酸序列。由

於 B domain 位置是 E₂ 蛋白中靠近 N-terminal 區，是整條胜太中最具免疫原性之區域 [10] [18]，此處的變異對於抗原性的改變影響很大。而胺基酸的改變、胺基酸間的醣化作用 (Glycosylation) 及胜太構形上 (Conformation) 的變化都會影響抗原性的表現。因此 E₂ 醣蛋白 B domain 位置上出現 6 個胺基酸的改變，是否會造成豬瘟強毒株與 LPC 疫苗毒之間抗原性的差異，則有必要進一步探討。下年度試驗可朝向設計一對可增幅 E₂ 醣蛋白高度變異區之引子，將此對引子針對目前已收集到的 68 株豬瘟野外分離毒進行 RT-PCR 反應，並將反應產物進行 PCR 產物直接定序，再轉譯成胺基酸序列，藉由樹狀圖分析，將豬瘟野外毒進行分類。經分類後選擇差異性最大的幾株代表野外毒來做攻毒試驗。即將 SPF 豬先行以 LPC 疫苗免疫。待抗體產生後再以野外毒來攻擊豬隻，並且檢視其免疫保護情形。

參考文獻

1. 潘居祥。(1995)。應用反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR) 及限制酶片段多形性(RFLP) 區別不同豬瘟病毒株。碩士論文。國立台灣大學獸醫學研究所。1995
2. 楊喜金、田淵清、清水悠紀臣。家兔腎臟培養細胞馴化兔化豬瘟毒 (RK-LPC)之性狀研究。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 No19,101-122, 1983
3. 劉培柏。豬瘟。紀念論文專輯，台灣省家畜衛生試驗所，P11-48, 1992
4. Edwards S, and Sands JJ. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. DTW Dtsch Tierarztl Wochenscher, Feb; 97 (2): 79-81, 1990
5. Kumagai T, Shimizu T, Ikeda S, Matumoto M. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. J Immunol 87 : 245-256, 1961
6. Lin TT-C, Lai SS. Detection and titration of lapinized hog cholera virus by means of tissue culture technique. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. For Anim. Health No7, 1-12, 1970
7. Mengeling WC, Drake L. Replication of hog cholera virus in cell culture. Am J Vet Res 30: 1817-1822, 1969
8. Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ, Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. Virology 171: 555-567, 1989
9. Moormann RM, Warmerdam PAM, Van der Meer B, Schaaper WM, Wensvoot G. Hulst Molecular MM. Cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. Virology, 177: 184-198, 1990
10. Muylldermans G, Caij A, De Smet A, Koenen F, Hamers R, Characterization of structural and non-structural proteins of hog cholera virus by means of monoclonal antibodies. Arch Virol 131(3-4): 405-

17,1993

11. Pan IC. Personal communication. 1992
12. Pirtle EC, Mengeling WL. Antigenic difference in two hog cholera virus strains. *Am J Vet Res* 32: 1473-1477, 1971
13. Shimizu Y, Furuuchi S, Kumagai T, Sasahara J. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell culture. *Am J Vet Res* 31: 1787-1794, 1970
14. Thiel HJ, Stark R, Weiland E, Rumenapf T, Meyers G. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol Sep*; 65 (9): 4705-12, 1992
15. Terpstra C. Hog cholera: an update of present knowledge. *British Vet J* 147: 397-406, 1991
16. Van Oirschot JT. Description of the virus infection, in classical swine fever and related viral infections. Edited by B Liess. Mortinus Nijhoff Publishing, P1-25, 1988
17. Van Rijn PA, Van Gennip HGP, de meijer ET, Moormann RJM. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain. *J General virology* 74 : 2053-2060, 1993
18. Van Rijn PA, Bossers A, Wensvoort G, Moormann Rj. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol Nov*;77(pt11) : 2737-45, 1996
19. Wensvoort G, Blemraad M, Terpstra C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 17: 129-140, 1998

The Antigenic Differences between LPC Seed Virus and Field Isolates of Hog Cholera Virus

C.H. Pan*, M.H. Jong, J.C. Huang, T.S. Huang, S.C. Yang, S.H. Lee and S.Y. Lin

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY Based on the studies of viral characterization and amino acid sequences, the antigenicity of hog cholera virus between LPC vaccine strain and field isolates was analyzed. Thirty-six field isolates chosen from 7 different restriction patterns were tested by exaltation of Newcastle disease (END) method and E^{-} interference test. The results indicated that 34 isolates belonged to the highly virulent strains and 2 isolates belonged to the less-virulent strains. LPC vaccine strain could be distinguished from ALD strain by determination of plaque sizes in indirect immuno-peroxidase plaque staining test (IIPS). however, the field isolates always exhibited different plaque sizes. By comparing the E_0 , E_1 and E_2 glycoprotein gene sequences between LPC and ALD strain, the similarity of amino acids was 94.7 %, however, there was a highly variable region in the B domain of the E_2 gene. In this highly variable region, six in 10 amino acids were different between sequences 471 to 480.

Keywords : *Hog Cholera Virus, Exaltation of Newcastle disease, Indirect immuno peroxidase plaque stain, Gene Sequence*