

## 壹、前言

新城病 (Newcastle disease, 以下簡稱 ND) 是由副粘液病毒科 (Paramyxoviridae) 的 Avulavirus 屬新城病病毒 (Newcastle disease virus, 以下簡稱 NDV) 所引起。禽類副粘液病毒 (paramyxovirus, 以下簡稱 PMV) 在血清學的分類可分為 PMV-1 (paramyxovirus type 1) 至 PMV-9 (paramyxovirus type 9) 等 9 個血清型；ND 病毒為 PMV-1 型。本病自 1926 年首次發現以來，已廣佈於全球大部份國家，因此世界各地雞隻大都需以疫苗來進行防疫。NDV 依其對雞感染的病原性高低和臨床症狀分為 5 個病原型包括：(1) 強毒內臟型：具有高病原性，常見胃腸出血病變，(2) 強毒神經型：呈現高度死亡率，通常有呼吸及神經症狀，(3) 中間毒型：呈現呼吸症狀，偶有神經症狀，但具低死亡率，(4) 弱毒型或呼吸道型：呈現輕微或無臨床症狀的呼吸道感染及 (5) 無症狀腸道型：沒有臨床症狀的腸道感染型。本病不易區別其病原型，即使病毒感染無特定病原 (SPF) 雞也會出現前述重疊的病狀，其中弱毒株感染時會因其他病原重複感染或環境情況不良而加劇本病臨床症狀，且病毒感染不同宿主也有不同的反應，使得 ND 在臨床診斷上頗為困難，因此若單靠臨床症狀來診斷本病常無法得到正確的診斷結果。

我國對新城病的定義是大腦內接種致病性指數 (intracerebral pathogenicity index, 以下簡稱 ICPI) 在 0.7 以上或融合蛋白 (F protein) 氨基酸序列第 113 至 116 個位置具有 3 個以上鹼性氨基酸且第 117 個位置為苯丙氨酸 (phenylalanine)。

## 貳、臨床症狀

### 一、一般症狀

臨床症狀的嚴重程度因病毒株及感染鳥類的年齡、免疫狀況、種別等因素而異，由幾乎無明顯的呼吸症狀到非常嚴重的沈鬱、產蛋量下降、呼吸頻率增加、大量下痢後死亡或存活者出現神經症狀。嚴重病型之死亡率可達 100%。潛伏期常為 5 至 6 天，亦可能為 2 至 15 天。

### 二、強毒內臟型

病程甚短，臨床上一發病就開始死亡，病雞出現食慾廢絕，體溫上升至 42 至 43 °C。病雞會出現精神沉鬱、嗜眠、逆毛及排出帶有白色的濃綠色下痢便，聚集在角落不動。眼、喉及臉部常見水腫，並由喉頭發出囉音及奇音或開口呼吸，無法起立及抽搐，一般經 1 至 3 日病程後就死亡。病程較長者開始出現斜頸、歪頭及腳麻痺。急性型之死亡率在 90% 至 100%。

### 三、強毒神經型

主要症狀為沉鬱、呼吸症狀、下綠色便及神經症狀等。產蛋降低或停止，肉垂及肉冠呈暗紫色，中雞以下的症狀較嚴重。病程經過較為慢性，成雞死亡率約 5%，小雞死亡率為 50 至 80%。

### 四、中間毒型

輕微的呼吸症狀及下痢，產蛋下降或停止。其死亡率低。

## 五、弱毒型

主要造成中等程度或不顯性的呼吸道感染，其死亡率極低。

## 六、無症狀腸道型

無臨床症狀或無病理學上變化。

## 參、病理變化

### 一、肉眼病理變化

#### 1.強毒內臟型病變

主要的病變在消化道（腺胃及腸管）的出血、潰瘍及壞死等病變。腺胃出血病變易出現於食道或腺胃移行部，有時全面性出血；腸管淋巴組織易出現出血、潰瘍及壞死等病灶；脾臟有時會出現白色壞死點；出現呼吸症狀之病例可見氣管粘膜增厚、充出血及滲出液增加。結膜充出血及眼瞼與顏面腫脹；卵巢異常；共泄腔充出血；華氏囊肥厚、水腫及充出血。心冠狀溝點狀出血。

#### 2.強毒神經型病變

主要的病變在呼吸道，包括氣管粘液增加、粘膜增厚、氣囊輕度混濁、增生增厚及肺炎之病變。

### 二、組織病理變化

1.全身各淋巴組織如脾、胸腺、華氏囊、盲腸扁桃、消化道及呼吸道之粘膜固有層、腦之血管周圍的淋巴球會崩壞及消失，並有巨噬細胞之增生。脾、胸腺及消化道的病灶伴有纖維素滲出。氣管上皮細胞增生。

2.急性病例的中樞神經系統可見血管周圍性淋巴細胞的增殖、神經細胞的壞死及小神經膠細胞反應。病程較長者血管周圍的浸潤細胞由漿細胞轉為淋巴球，大腦、中腦、視葉、延腦及小腦出現壞死灶。

## 肆、實驗室檢驗

### 一、病毒檢驗

#### (一)採取病材

1.由新鮮死雞或瀕死雞之臟器分離病毒較佳。因此，由病死雞中採取口、鼻拭子及肺、腎、腸（包括腸內容物）、脾、腦、肝及心臟等組織臟器。所採取之組織臟器可以分開或混合，但腸管則通常分開放置。

2.活雞採樣包括氣管及共泄腔拭子，共泄腔拭子一定要包含有糞便。小型脆弱的禽類可能受限於拭子太大而不容易採取，則以收集排出之新鮮糞便代之。

3.採取的試材應放在磷酸鹽緩衝溶液（phosphate buffered saline，以下簡稱PBS）內，pH 7.0 至 7.4，含抗生素。所加抗生素可因地置宜，如組織及氣管拭子添加 penicillin（2,000 u/ml）、streptomycin（2 mg/ml）或 gentamicin（50 µg/ml），前述糞便及共泄腔拭子試材則須提高抗生素濃度 5 倍以上。添加抗生素後必須調整 pH 值為 7.0 至 7.4。糞便及組織研製成 10 至 20%（w/v）乳劑。乳劑在室溫放置 1 至 2 小時後應馬上進行試驗，如存放在 4°C 不可超過 4 天。

## (二)病毒分離

1.糞便或組織乳劑經由 1,000 g 轉速離心 10 分鐘，溫度不超過 25°C，所得上清液經 0.45 μm 過濾膜濾過後之濾液接種於 9 至 11 日齡 SPF 雞胚尿囊腔內，每個雞胚各接種 0.2 ml。接種後在 35°C 至 37°C 恒溫箱中靜置觀察 4 至 7 天。

2.將死胚蛋與未死亡胚蛋放置在 4°C，待 10 小時以上降溫後抽取尿囊液，同時取少量尿囊液與 5% 雞紅血球懸浮液進行平板血球凝集試驗或 1% 雞紅血球懸浮液進行試管血球凝集試驗(hemagglutination test，以下簡稱 HA)，以檢測血球凝集素(hemagglutinin) 活性之有無，若呈陰性反應則應再盲目繼代增殖 2 次。

## (三)病原鑑定

血球凝集試驗中，A 型流行性感冒病毒或其他 8 種血清型副黏液病毒或含有血球凝集的細菌等亦會產生血球凝集現象，因此，均會影響判定。此時可以使用特異新城病抗血清進行血球凝集抑制試驗(hemagglutination inhibition test，以下簡稱 HI) 來同定。

## (四)病原性鑑定

由於新城病病毒毒力強弱之不同及活毒疫苗廣泛地被使用，所以由出現臨床症狀的病雞所分離之新城病病毒，必須再進一步進行鑑定，方法如下：

1.雞胚平均死亡時間(mean death time in eggs，以下簡稱 MDT)

(1)抽取新鮮 ND 病毒液以滅菌生理鹽水連續 10 倍稀釋成 10<sup>-6</sup> 至 10<sup>-9</sup>，每一稀釋倍數濃度分別接種 0.1ml 至 5 個 9 至 10 日齡 SPF 雞胚尿囊腔，然後放置在 37°C 孵卵器中。

(2)每一稀釋倍數接種後剩餘的病毒存放在 4°C，8 小時後再各接 5 個雞胚蛋，同樣置 37°C 中。每日 2 次照蛋檢查，連續 7 日，記錄雞胚死亡時間。造成接種雞胚全部死亡的最高稀釋倍數即為最小致死劑量(the minimum lethal dose)，MDT 即為最小致死劑量殺死胚胎的平均時間。

(3)MDT 小於 60 小時為強毒株，60 至 90 小時為中間毒株，大於 90 小時為弱毒株。

2.大腦內接種致病性指數(ICPI)

(1)抽取新鮮 ND 病毒液(HA 力價須高於 16 倍者)以滅菌生理鹽水稀釋 10 倍，取該稀釋液 0.05 ml 分別大腦內接種於 10 隻 1 日齡 SPF 小雞，接種後每 24 小時觀察一次，連續觀察 8 日並記錄之。

(2)正常雞之記錄值為 0，病雞為 1，死亡雞為 2，ICPI 即為全部 8 日內每日每隻雞的平均數值，所以 ICPI 值 1.5 以上則為強毒型新城病，而弱毒株的值則接近 0。

3.靜脈內接種致病性指數(intravenous pathogenicity index，以下簡稱 IVPI)

抽取新鮮 ND 病毒液(HA 力價高於 16 倍)以滅菌生理鹽水 10 倍稀釋，取該稀釋液 0.1 ml 分別靜脈內接種於 10 隻 6 週齡 SPF 雞，接種後 10 日內每日觀察雞死亡(記錄值為 3.0)、麻痺(記錄值為 2.0)和發病(記錄值為 1.0)情形，並計算其毒性平均數值，弱毒株和一些中間毒株之 IVPI 值近似 0，而強毒株的 IVPI 值約為 3.0。

4.單源抗體

以小鼠(Balb/C)研製成的抗 ND 病毒單源抗體(monoclonal antibodies，以下簡稱 Mabs)可藉由 HI 方法快速鑑定不同血清型別的禽類副黏液病毒，此項技術可去除免於多價(polyclone)抗 ND 病毒血清與其他禽類副黏液病毒的交叉反應的問題。由於 Mabs 在 HI 時對不同 ND 病毒株具有特異性，因此若有多種 Mabs，可基於他

們各自是否和某種病毒發生特異性反應的情形來建立 ND 病毒的分類及鑑別，尤其可應用快速鑑別是否為 ND 強毒株。

## 二、血清學檢測：

可利用 HI、中和試驗或酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay，以下簡稱 ELISA)等血清學試驗診斷新城病。目前，HI 最常被廣泛使用。一般雞群血清在進行血清學試驗時很少有非特異陽性反應發生，所以不需任何前處理，但其他品種的家禽血清有時會與雞紅血球發生非特異性凝集現象，因此，在進行血清學試驗時必須利用雞紅血球先行吸附以去除其他非特異性因子，方能獲得正確的血清試驗值。加有抗凝血劑之雞新鮮血液，必須以 PBS 溶液洗三次，然後懸浮製備成 1% RBC 溶液。每次試驗時應同時放入陽性和陰性對照血清。

### (一)血球凝集試驗

1. PBS 溶液分裝至 96 孔塑膠微量孔盤中每一孔，每孔 0.025 ml。
2. 每行第一孔放置 0.025 ml 病毒懸浮液（如感染的尿囊液）。
3. 進行 0.025 ml 病毒液 2 倍連續稀釋。
4. 每孔再加 0.025 ml PBS 溶液。
5. 最後每孔加入 0.025 ml 的 1% 雞 RBC 溶液 (v/v)。
6. 輕輕振盪混合，室溫 (25°C) 中靜置 40 分鐘，或 4°C、60 分鐘，直到紅血球沉降至底部。
7. 將盤子傾斜觀察紅血球淚滴狀流下之有無，以決定血球凝集現象。病毒力價之計算係以判讀血球完全凝集孔中（不產生淚滴狀流下現象）最高稀釋倍數即成為 1 單位血球凝集力價(hemagglutination unit，以下簡稱 HAU)，所以該稀釋力價倍數的倒數為受檢測病毒懸浮液的血球凝集力價。

### (二)血球凝集抑制試驗

1. 取 PBS 溶液分裝至 96 孔塑膠微量孔測定盤中，每一孔 0.025 ml。
2. 加入 0.025 ml 血清至測定盤中每行的第一孔。
3. 自第一孔起，取 0.025 ml 量進行 2 倍連續稀釋。
4. 每孔加 4 HAU 的病毒抗原 0.025 ml 並輕輕混合後，靜置於室溫中 30 分鐘或 4°C 靜置 60 分鐘。
5. 加 0.025 ml 1% 雞 RBC 懸浮液至每一孔並輕輕混合後，靜置室溫中約 40 分鐘或 4°C 靜置 60 分鐘，對照之 RBC 懸浮液應完全沉降至底部。
6. HI 力價判定：形成 4 HAU 抗原完全抑制之最高血清稀釋倍數即為 HI 力價。
7. 陰性對照血清的力價 HI 不應大於 1/4，陽性對照血清 HI 力價應和已知力價相同，否則應重做或修正之。

國際標準 ND 抗血清可自國際畜疫會 (OIE) 參考實驗室取得冷凍乾燥的雞抗血清或實驗室自製標準血清。許多商品化的新城病 ELISA 套組也可使用，用於檢測新城病病毒抗體之 ELISA 套組依其原理分為直接法、三明治法及阻斷法或競爭法等。

## 三、病毒核酸序列分析

### (一)病毒 RNA 萃取

有兩種方法，第一種為利用以商品化之 RNA 萃取套組，其操作步驟請按廠商所附

步驟進行。第二種方法為利用有機溶劑萃取，其方法簡述如下：

病毒尿囊液和病材之臟器組織作成 10 倍乳劑。取 100 $\mu$ l 病材乳劑加入 1 ml 核酸萃取液(Trizol solution)充份混合 30 秒並靜置室溫 5 分鐘，加入 200  $\mu$ l 氯仿(chloroform)以手動上下倒置混合 15 秒後靜置室溫 3 分鐘，置於 4 $^{\circ}$ C 下 12,000 g 離心 15 分鐘。取上清液與等量 isopropanol 充分混合靜置室溫 10 分鐘，再置於 4 $^{\circ}$ C 下 12,000 g 離心 15 分鐘。倒棄上清液加入 1 ml 75% 乙醇後於 4 $^{\circ}$ C 下 14,000 g 離心 5 分鐘後去上清液。置 56 $^{\circ}$ C 烘箱或真空乾燥去除水份後加入 60 至 80 $\mu$ l 含 DEPC (diethylpyrocarbonate)處理過的無菌水溶解，迅即進行 RT-PCR 過程。

(二)反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)操作過程

參考現有文獻，列出二組 F 基因之特異性引子供參考，第一組之參考文獻為：Avian Diseases (1999)43：125-130；第二組之參考文獻為：J. Clin. Microbiol. (1995)33：2624-2630。

而二組引子之序列與 RT-PCR 條件如下：

第一組：

F47 (+)：ATG GGC (T/C)C(T/C) A(A/G)A (T/C)CT TCT AC

F580(-)：CTG CCA CTG CTA GTT G(G/T)G ATA ATC C

增幅產物大小：534 bp

反轉錄聚合酶鏈反應條件

1.反轉錄作用：單一循環：42 $^{\circ}$ C，60 分鐘

2.聚合酶鏈反應：三十五個循環，94 $^{\circ}$ C 30 秒，51 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘。單一循環，72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。

第二組：

F1: 5'-CCTTGGTGA(C/T)TCTATCCG(C/T)AG-3'

F2: 5'-CTGCCACTGCTAGTTG(T/G)GATAATCC-3'

增幅產物大小：254 bp

反轉錄聚合酶鏈反應條件：

1. 反轉錄作用：單一循環，42  $^{\circ}$ C 60 分鐘。

2. 聚合酶鏈反應：三十五個循環，94  $^{\circ}$ C 30 秒，50  $^{\circ}$ C 30 秒，72  $^{\circ}$ C 1 分鐘。單一循環，72  $^{\circ}$ C 7 分鐘。

(三)核酸序列分析

將步驟五(二)合成之 PCR 產物進行自動核酸序列分析，分析融合蛋白氨基酸序列，第 113-116 個位置若具有 3 個以上鹼性氨基酸且第 117 個位置為苯丙氨酸 (phenylalanine) 即判定為新城病。

(四)注意事項

抽取待測病材乳劑之核酸時，必須同時作已知陽性病材乳劑及已知陰性病材乳劑之核酸抽取，再一起作 RT-PCR 反應。所得結果必需為已知陽性病材有預期 RT-PCR 產物，而且陰性病材沒有，在此前提下待測病材所得之結果才具可靠性。

伍、參考文獻：

1. Alexander D.J. (1997). Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M., eds. 541-570.

2. Alexander D.J. & Allan W.H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol.*, 3, 269-278.
3. Alexander D.J., Banks J., Collins M.S., Manvell R.J., Frost K.M., Speidel E.C. & Aldous E.W. (1999). Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet. Rec.*, 145, 417-421.
4. Beard C.W. & Hanson R.P (1981). Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*, Eighth Edition, Hofstad M.S., Barnes H.J., Calnek B.W., Reid W.M. & Yoder H.W., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 452-470.
5. Collins M.S., Franklin S., Strong I, Meulemans G. & Alexander D.J. (1998). Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, 27, 90-96.
6. Hanson R.P. (1980). Newcastle disease. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Hitchner SB., Purchase HG. & Williams J.E., eds. AAAP, College Station, Texas, USA, 63-66.
7. Jestin V., Cherbonnel M. & Arnauld C. (1994). Direct identification and characterisation of APMV-1 from suspicious organs by nested PCR and automated sequencing, Alexander D.J., ed. *Proceedings of the Joint First Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of the European Communities*, Brussels, Belgium, 1993, 89-97.
8. Kant A., Koch G., Van Roozelaar D.J., Balk F. & Ter Huurne A. (1997). Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, 26, 837-849.
9. Lomnicizi B., Wehmann E., Herczeg J., Ballagi-Pordany A., Kaleta E.F., Werner O., Meulemans G., Jorgensen P.H., Mante A.P., Gielkens A.L.J., Capua I. & Damoser J. (1998). Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch. Virol.*, 143, 49-64.
10. Oberdorfer A. & Werner O. (1998). Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. *Avian Pathol.*, 27, 237-243.
11. Seal B., King D.J. & Bennett J.D. (1995). Characterisation of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2624-2630.
12. Takakuwa H., Ito T., Takada A., Okazaki K. & Kida H. (1998). Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn J. Vet. Res.*, 45, 207-215.