

## 假性狂犬病TK<sup>-</sup>變異株之病原性及其免疫保護效力

鍾明華 劉堂輝 詹益波 邱資峰 紀長文

台灣省家畜衛生試驗所

假性狂犬病本省分離毒P7, TNL及C2A株, 於LTK<sup>-</sup>細胞中以BUdR馴化14代後, P7與C<sub>2</sub>A株對一日齡雛鷄仍具強烈病原性, 而TNL株則大為減弱, 當TNL株再經ara-T馴化至21代時, 對一日齡雛鷄已不具病原性, 在HAT培養液中亦無法增殖, 也無法在鼻腔及肌肉內接種五週齡小豬之三叉神經、大腦及其他內臟器官中發現潛伏的病毒, 對一週齡內幼齡哺乳仔豬亦無病原性, 也未造成潛伏感染; 幼齡仔豬於免疫45天後以強毒攻擊之, 對照豬全數斃死, 免疫豬則耐過。從攻毒後排毒天數, 體溫上昇天數及攻毒時之中和抗體價比較結果, 肌肉內免疫效果較鼻腔內為優。但此TK<sup>-</sup>變異株在試管內却不甚安定, 有迴歸之趨勢。

假性狂犬病(PR)為目前威脅本省養豬事業的重要傳染病之一, 本所在農委會支持下, 不活化疫苗業已商品化供應本省養豬農戶使用, 但國內、外報告均顯示, 無論不活化疫苗或次單位疫苗皆無法保護免疫豬隻再感染, 亦無法阻止野外毒之殖增(colonization), 因此病毒始終存在於豬場, 而無法根除<sup>(5)</sup>。活毒疫苗在歐美地區仍被普遍使用, 而活毒疫苗之優點乃為眾所週知之事<sup>(5)(6)</sup>, 但日前歐美地區市售活毒疫苗對小白鼠、家兔、幼齡仔豬等仍具病原性, 為避免此一缺憾, 開發無胸腺嘧啶激化酶(thymidine kinase deficient, TK<sup>-</sup>)變異株為一可行之路。報告顯示PR病毒TK<sup>-</sup>變異株不僅對小白鼠、家兔、山羊等無病原性外<sup>(7)(12)</sup>, 更能阻止野外毒株在豬隻神經節及呼吸道上皮細胞之殖增<sup>(9)</sup>。本報告係以BUdR及ara-T使本省分離毒株產生TK<sup>-</sup>變異株, 一面檢討其病原性, 一面測定其安定性。

### 試驗材料與方法

1. 供試病毒: P7株為屏東農專分離撥讓; TNL株係本所分離; C2A株則由TNL株經株選(cloning)後馴化於牛睪丸細胞(BT)者。
2. 供試細胞: LTK<sup>-</sup>為老鼠細胞經過株選無TK活性者; RK-13為兔腎株化細胞; ST為豬睪丸株化細胞。三種細胞均以含8% FCS(牛胎兒血清)之EMEM, 加入標準量抗生素之培養液培養之。病毒接種後之維持液則加入3% FCS。
3. TK<sup>-</sup>變異株之分離及株選: 依前實驗<sup>(2)</sup>, 繼續將自荷蘭攜回之P7, TNL及C<sub>2</sub>A BUdR馴化株通過LTK<sup>-</sup>細胞至14代, TNL株則繼續以ara-T馴化至21代。病毒接種後之維持液內BUdR含量則從100 mcg/ml提高至200 mcg/ml, 其間並以斑灶形成株選多次。另外取P7及TNL原毒, 以100 mcg/ml ara-T分別馴化至11代至12代, 其間亦經多次株選。
4. 馴化株對動物之病原性實驗:
  - (1) 小白鼠接種: 依前實驗<sup>(2)</sup>行之, 24隻小

- 白鼠分爲四組，每組6隻，分別皮下注射  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> / 0.1 ml 之馴化14代病毒及TNL病毒。
- (2) 一日齡雞接種：各馴化病毒及TNL原毒注入雞腦內，每隻  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> / 0.1 ml，並以含100 mcg/ml BUdR之EMEM做爲對照。
- (3) 家兔接種：20頭2公斤體重家兔，分爲四組，第1—3組各6頭，分爲肌肉注射  $10^{6.0}$ 、 $10^{6.5}$  及  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 及P7，TNL及C<sub>2</sub>A BUdR馴化14代病毒，每階病毒注射兩頭。第4組2頭注射含BUdR之EMEM做爲對照。
- (4) 小豬接種：4頭無PR抗體小豬，分別以肌肉內、鼻腔內接種  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml 馴化21代之TNL株病毒 (TNL-BUdR-ara-T<sub>7</sub>, LTK<sub>71</sub>)，另有2頭做鼻腔內接種豬同居感染。所有豬隻接種後每天測量體溫，觀察症狀，並採取扁桃棉拭 (tonsil swab) 分離病毒，45天後解剖採取嗅球、腦橋、扁桃、肝、脾、腎上腺等組織做成乳劑分離病毒，三叉神經則予剪片後移植於RK-13單層細胞上。
5. TK活性迴歸試驗：分別將TNL株馴化14代 (TNL-BUdR, LTK<sub>74</sub>(3)) 及21代 (TNL-BUdR-ara-T<sub>7</sub>, LTK<sub>71</sub>(1)) 病毒以ST及RK-13細胞連續繼代10次 (TNL-BUdR, LTK<sub>74</sub> ST<sub>10</sub>(4); TNL-BUdR, LTK<sub>71</sub> RK<sub>10</sub>(2)，另取NTL株 ara-T 馴化12代 (TNL-ara-T, LTK<sub>72</sub>(5) 及TNL原毒(6)，依McGregar<sup>(6)</sup>略予修飾後將各病毒接種於LTK-細胞中 (MOI=0.1)，經吸著後清洗四次，再把感染細胞分成三組：第一組加入EMEM維持液後立刻凍結保存；第二組加入含HAT之EMEM維持液；第三組加入不含HAT之EMEM維持液，二、三兩組細胞置於37℃ CO<sub>2</sub> 暖箱中培養，26小時後予以凍結保存。三組感染細胞解凍一次後以RK-13細胞測定病毒力價。
6. 血清中和試驗：依前實驗<sup>(1)</sup> 行之，但將病毒與血清感佳時間延至24小時，然後才加入RK-13細胞。
7. TK-變異株對幼齡哺乳仔豬之病原性及其保護效力：兩窩生自無抗體母豬之14頭7日齡哺乳仔豬分爲四組。第一窩有8頭，其中6頭爲第一組，肌肉內注射  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> BUdR馴化21代病毒，另外兩頭爲第二組，供同居感染用；第二窩有6頭，其中4頭爲第三組，鼻腔內接種  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 馴化病毒，其他2頭爲第四組，供同居感染用。
- 病毒接種後每天測量體溫，至採取扁桃棉拭，實施病毒分離，爲期6天。30天後 (PVD 30) 各組中取半數隔離後連續注射四天之Dexamethasone (1.5 mg/kg體重)，從注射第一劑量起每天測量體溫並採取扁桃棉拭。45天後 (PVD 45)，各組中之另外一半小豬，連同新購入之3頭同齡小豬 (group 5) 點鼻接種  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 之P7強毒 (試驗設計見表1)，然後每天測量體溫，採取扁桃棉拭，觀察發病情形。扁桃棉拭先以無菌注射筒將浸泡於培養液中之桃球充分擠乾，經離心後接種RK-13細胞，24小時後依CPE之程度判讀之。

## 結 果

1. 馴化毒對實驗動物之病原性：(如表2)
- (1) 對小白鼠之病原性：在各種不同馴化程度的病毒中，祇有TNL株在BUdR及ara-T馴化21代表 (group 1) 對一日齡雞已無病原性；馴化14代時 (group 3) 尚具些微病原性。不過，馴化14代毒經過RK-13細胞10代後，僅10%雞耐過 (group 4)。
- (2) 對小白鼠之病原性：TNL, P7及C<sub>2</sub>A病毒經BUdR馴化14代 (group 3, 7, 8) 對小白鼠無病原性；注射TNL原毒者，全數斃死 (group 9)。
- (3) 對家兔的病原性：TNL, P7及C<sub>2</sub>A株馴化14代病毒可以輕易地殺死家兔，對家兔具強烈的病原性。
2. 馴化毒對五週齡小豬之病原性：五週齡無抗體小豬當接種  $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub> 之21代馴化病毒後，體溫在接種3、4天後有輕微的上升

(40.3 °C)，但無明顯的臨床症狀。扁桃腺棉拭病毒分離結果，僅能從鼻腔內接種豬 (P 65-66) 檢出微量的病毒，不能構成傳染，共同居感染 (P 63-64) 保持抗體陰性，未排毒，肌肉接種豬 (P 61-62) 亦無排毒。解剖後均無法從各臟器及三叉神經分離到病毒 (表 3)。

3. 馴化毒之 TK 活性及其迴歸：TNL 株經 BUdR 及 ara-T 馴化 21 代後，接種 LTK<sup>-</sup> 細胞後，未能於 HAT 培養液中增殖，未形成 CPE (其他病毒則產生 75-100% CPE)，其病毒力價 ( $10^{2.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml) 比吸著 1 小時者 ( $10^{4.0}$ ) 還低，在正常的維持液中則高達  $10^{7.7}$ ，差異至為明顯。可惜此 TK<sup>-</sup> 變異株經 RK-13 細胞培養 10 代後，在 HAT 培養液中之病毒力價 ( $10^{5.8}$ ) 較吸著 1 小時者略高 ( $10^{6.0}$ )，但尚遠低於正常維持液者 ( $10^{8.0}$ )。其他各馴化病毒亦有類似情形，反觀 TNL 原毒不論在正常或 HAT 培養液中之病毒力價均相當 (表 4)。
4. 馴化毒對一週齡哺乳仔豬之病原性及其保護效力：馴化 21 代病毒對哺乳仔豬之各項試驗設計如表 4。

(1) 哺乳仔豬接種 TK<sup>-</sup> 變異株後排毒情形：哺乳仔豬肌肉內接種變異株病毒後未造成排毒，共同居對照仔豬 (group 2) 亦然。鼻內接種仔豬則多有排毒現象，但其同居對照仔豬 (group 4) 則未能檢出病毒。所有仔豬在接種後均健康如常，體溫亦維持正常 (40 °C 以下) 半數之試驗仔豬在變異株病毒接種 30 天後，連續注射四劑量之 Dexamethasone，結果顯示豬隻體溫正常，亦未能檢出病毒。由此可知，以 BUdR 及 ara-T 馴化 21 代後 TNL-TK<sup>-</sup> 變異株對一週齡仔豬十分安全，且不會造成潛伏感染。

(2) 哺乳仔豬攻毒後之排毒情形：未注射 Dexamethasone 之另外一半仔豬，於病毒接種 45 天後，以  $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub> 之 P7 強毒攻擊後，所有豬隻均可檢出病毒，但 3 頭肌肉注射仔豬中有一頭僅於攻毒後第一天檢出病毒。從病毒排出量言，對照豬

(C1—C3) 及同居感染豬 (P 121, P 129) 排出較多的病毒，而鼻內接種者最少 (表 5)。

- (3) 哺乳仔豬在 TK<sup>-</sup> 變異株免疫接種後 (PVD)：Dexamethasone 注射後 (P-DMD) 及攻毒後 (PCD) 之抗體反應：哺乳仔豬在病毒接種後之抗體上昇相當緩慢，肌肉內接種 14 天後，僅可測得 1:7.3 之抗體，然後才慢慢爬升，45 天後 (PVD 45，亦即 PCDO) 尚有 1:32 之抗體力價。鼻內接種者，抗體反應極差，始終在 1:2 之極低力價，但攻毒 14 天後 (亦即 PVD 59)，兩者皆為 1:180，無甚差異 (表 6)。

由表 6 又可知，Dexamethasone 之注射，對抗體無激活作用，注射前 (PVD 30，亦即 PDMD 0) 與注射 14 天後 (PVD 44，亦即 PDMD 14)，鼻內接種者抗體未變，肌肉內接種者有些微的上昇，從 1:24 上昇至 1:45。

- (4) BUdR 及 ara-T 馴化 21 代 TNL-TK<sup>-</sup> 變異株對哺乳仔豬之免疫保護效力：

哺乳仔豬以肌肉內 (group 1) 及鼻腔內 (group 3) 接種  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>，TNL-TK<sup>-</sup> 變異株病毒 45 天後，以強毒攻擊結果，所有同居感染豬 (group 2 及 4) 與對照豬 (group 5) 均發 41 °C 以上高燒，並在 4—5 天內斃死；而所有免疫仔豬均無異狀耐過，其中肌肉注射豬有 2 天體溫超過 40 °C (表 7、圖 1)。

## 討 論

儘管小白鼠可用來區別 PR 強毒、弱毒及 TK<sup>-</sup> 疫苗<sup>(11)</sup>，本實驗發現小白鼠對 PR 病毒具相當強的抵抗力，Lomniczi 亦稱小白鼠腹腔內注射 LD<sub>50</sub> 僅達  $5 \times 10^4$  (10)，如果在 TK<sup>-</sup>-TK<sup>+</sup> 混合病毒中含有少數的 TK<sup>+</sup> 病毒，小白鼠很可能不發病耐過。Lomniczi 復認一日齡雞腦內接種為測定 PR 病毒病原性的最佳模式<sup>(12)</sup>；本試驗成績顯示經 BUdR 馴化 14 代之三株病毒對雞腦皆具病原性，但接種等量病毒之小白鼠卻全數耐過。由此可知，小

白鼠可能不適於 TK<sup>-</sup> 變異株病原性的推定。

TK 活性對 PR 等病毒的病原性的表現十分重要，但卻不是唯一決定因素，在 PRV DNA 核酸 Us 片段中的基因對雞的病原性也有影響<sup>(4)(10)(12)</sup>，Tatarov 曾以 BUdR 開發對家兔、綿羊無病原性的 TK<sup>-</sup> 疫苗，本實驗中所有接種家兔無一倖存，家兔是否與雞雞一樣，除了與 TK 有關外，Us 片段中的基因也扮演一部份角色<sup>(10)</sup>？本實驗所用的 TNL 分離株有完整的 Us 片段<sup>(9)</sup>。

誠如 Tenser 言，autoradiography 對個別的 PR 病毒的 TK 活性是一種非常精確而有用的判定方法<sup>(12)</sup>，但其可判讀的病毒數量有限為其缺點，前實驗未發現 TK<sup>+</sup> 表型的病毒<sup>(2)</sup>，卻能在 HAT 培養液內增殖，可知在前實驗中已認定為 TK<sup>-</sup> 變異株病毒群中尚有 TK<sup>+</sup> 病毒存在，此一推斷可由一日齡雞腦內接種成績互相印證。TNL 株經 BUdR 及 ara-T 馴化 21 代後，再通過 RK-13 細胞 10 代，對雞雞又恢復了病原性，在 HAT 培養液中的病毒力價，亦有異樣，究竟在通過 RK-13 細胞前及後的病毒群中含有多少 TK<sup>+</sup> 病毒，還得依賴 autoradiography 求證之，在諸多 TK 活性測定方法中，似無一可推斷，必須配合使用才能論斷。

馴化 21 代之 TNL-TK<sup>-</sup> 變異株接種小豬後，以病毒分離方法未能在三叉神經及內臟

器官中發現潛藏的病毒，為進一步了解潛伏感染 (latent infection) 之可能性，應於接種後注射腎上腺素求證<sup>(15)</sup>。因此，幼齡仔豬在接種 30 天後，連續注射 Dexamethasone 四天，結果並未造成排毒，體溫亦維持正常，從表 6 發現，肌肉免疫豬隻在注射腎上腺素後 (PVD 44) 之平均抗體價雖較攻毒前 (PVD 45) 為高，但差異不大，更從鼻腔內免疫豬之抗體在注射腎上腺素前後未發生變化觀之，此一 TK<sup>-</sup> 變異株不僅對幼齡哺乳豬無病原性，且無造成潛伏感染之虞。

TK<sup>-</sup> 變異株免疫仔豬攻毒前之抗體產生及攻毒後之平均發熱天數、排毒天數觀之，肌肉內接種豬 (group 1) 之表現均較鼻腔內接種者 (group 3) 為佳 (表 7)。此結果與 De Leeuw<sup>(6)</sup> 所得結論不一致，有待再作求證。由於同居感染及對照豬均於攻毒後 4—5 天內發病死亡，因此無法比較免疫豬與前二組豬在平均發熱及排毒天數之優劣。

由本試驗之各項成績顯示，TNL 株經 BUdR 及 ara-T 馴化 21 代後所得之 TK<sup>-</sup> 變異株之安全性甚高，免疫效力亦甚佳，可惜它在試管內之安定性可疑，必須再加馴化。而 in vivo 之安定性試驗，則因接種後排出之病毒量極低，無法構成第二代感染。此或為國外文獻皆無 in vivo 安定性試驗成績之故吧！?

Table 1. Experimental design for the pathogenicity of the 21st passaged TNL-TK<sup>-</sup> mutant to 1-week-old piglets.

Group	No. piglet	Vaccination (route)	Dexamethasone <sup>1</sup> injection	Challenge <sup>2</sup>
1	P115-117	+ (IM)	-	+
	P118-120	+ (IM)	+	-
2	P121	-	-	+
	P122	-	+	-
3	P123-124	+ (IN)	-	+
	P125-126	+ (IN)	+	-
4	P127	-	-	+
	P128	-	+	-
5	C1-C3	-	-	+

1. Four consecutive doses were given 30 days after vaccination.

2.  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> virulent virus was inoculated intranasally 45 days after vaccination.

Table 2. Pathogenicity of pseudorabies viruses to day-old chicks, mice and rabbits at different passaged level under the presence of BUdR or ara-T.

Group	Virus	Day-old chicks	Mice	Rabbits
1	TNL-BUdR-ara-T <sub>7</sub> -LTK <sup>-</sup> <sub>21</sub>	10/10 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	0/3
2	TNL-BUdR-ara-T <sub>7</sub> -LTK <sup>-</sup> <sub>21</sub> RK <sub>10</sub>	5/10	ND	ND
3	TNL-BUdR-LTK <sup>-</sup> <sub>14</sub>	16/18	6/6	0/6
4	TNL-BUdR-LTK <sup>-</sup> <sub>14</sub> ST <sub>10</sub>	1/10	ND	ND
5	TNL-ara-T-LTK <sup>-</sup> <sub>12</sub>	2/8	ND	ND
6	P7-ara-T-LTK <sup>-</sup> <sub>11</sub>	0/8	ND	ND
7	P7-BUdR-LTK <sup>-</sup> <sub>14</sub>	0/6	6/6	0/6
8	C2A-BUdR-LTK <sup>-</sup> <sub>14</sub>	0/6	6/6	0/6
9	PRV-TNL	0/4	0/6	ND
10	Control(BUdR)	4/4	ND	2/2

a. X/Y: survived/tested.

b. ND: Not done.

Table 3. Virus isolation from tonsil swabs and visceral organs of pigs infected with the 21st passaged TNL-TK<sup>-</sup> mutant.

No.pig	Tonsil swab (PID)										Trigeminal nerve & organ	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
P61-62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P63-64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P65-66	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Table 4. Yield of PRV-TNL strain of different passage under various conditions.

Medium	Virus yield (TCID <sub>50</sub> /ml) (log <sub>10</sub> )					
	1	2	3	4	5	6
EMEM (1 hr)	4.0	5.0	3.8	4.8	4.7	ND
HAT (26 hrs)	3.8	5.8	5.8	5.7	6.0	8.0
EMEM (26 hrs)	7.7	8.0	7.8	6.8	8.0	7.8

Table 5. Virus isolation from tonsil swabs of vaccinated piglets after challenge with a virulent strain.

Piglet No.	Day post-challenge (PCD)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P115	-	2+	-	-	2+	+	-	+	-	- <sup>a</sup>
P116	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
P117	-	+	+	+	+	2+	+	+	-	-
P121	-	3+	2+	+	+	4+	D <sup>b</sup>			
P123	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
P124	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
P127	-	2+	+	+	+	D				
C1	-	2+	+	2+	3+	D				
C2	-	2+	+	+	+	D				
D3	-	+	+	+	-	D				

a. CPE was scored at 24 PIH.

b. D: Died.

Table 6. Neutralizing antibody responses of pigs after vaccination, dexamethasone injection and challenge.

Group	Day post-vaccination (PVD)					
	0	14	30 <sup>a</sup>	44 <sup>b</sup>	45 <sup>c</sup>	59 <sup>d</sup>
1	0	7.3	24	45	32	180
2	0	0	0	0	0	ND
3	0	2	2	2	2	181
4	0	0	0	ND	0	ND

a = PDMD 0      c = PCD 0  
 b = PDMD 14     d = PCD 14

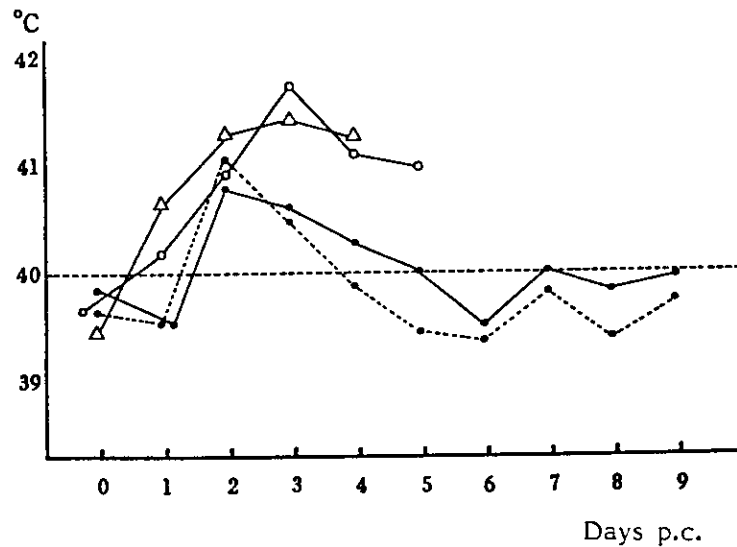


Fig. 1. Mean body temperatures of piglets after challenge.  
 ..... IM,    .——. IN,    o——o sentinels,  
 Δ——Δ controls.

Table 7. Immunoprotection of the 21st passaged TNL-Tk<sup>-</sup> mutant to the piglets against challenge.

Group	Mean serum titer when challenged	Dead/survived	Mean days of fever	Mean days of virus shedding
1	32	0/3	2	4
2&4	0	2/0	≥ 5	≥ 4.5
3	2	0/2	3	4.5
5	0	3/0	≥ 4	≥ 3.3

### 誌 謝

本研究計畫蒙行政院農委會 76 農建—8.1 一牧—22 (4) 經費補助，並承家畜衛生科，林再春科長及劉永和技正及本所邱仕炎所長之指導與鼓勵，始得以完成，謹誌萬分謝忱；本所病理研究室楊喜吟先生及李淑慧小姐協助之功亦一併謝之。

### 參 考 文 獻

1. 鍾明華、賴秀總：皮內遲發型過敏性反應作為豬假性狂犬病之診斷法，中華民國獸醫學會雜誌 8：151—154，1982。
2. 鍾明華。J.T.Oirschot: 豬假性狂犬病病毒 TK<sup>-</sup>變異株之分離及其性狀，省畜衛試研報 22: 73—79，1986。
3. 鍾明華：未發表資料。
4. Berns, A., A. Van Den Ouweland, W. Quint, J. Van Oirschot and A. Gielkens: Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. J. Virol. 53:89-93.1985.
5. De Leeuw, P.W. and J.T. Van Oirschot: Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory condition. Vet. Quarterly 3:191-197.1985.
6. De leeuw, P.W. and J.T. Vab Oirschot: Intranasal Vaccination



- of pigs against Aujeszky's disease: comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titers. *Res. in Vet. Sci.* 39:34-38, 1985.
7. Kit, S., M. Kit and E.C. Pirtle: attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. *Am. JVR* 46:1359-1367, 1985.
  8. McFerran, J.B. and C. Dow: Studies on immunisation of pigs with the bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 19:17-22, 1975.
  9. McGregor, S., B.C. Easterday, A.S. Kaplan, T. Ben-porat: Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. *Am JVR* 46:1494-1497, 1985.
  10. Lomniczi, B., S. Watanabe, T. Ben-porat and A.S. Kaplan: Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. *J. Virol.* 52:198-205, 1984.
  11. Tatarov, G.: Het ontwikkelen van een a virulente mutant van het virus van de ziekte van Aujeszky onder invloed van de inwerking van 5-bromo-deoxyuridine *tijdschr diergn. esk.*, deel 108, aft 5:204-209 1983.
  12. Tenser, R.B., J.G. Jones, S.T. Ressel and F.A. Fralish: Thymidine plaque autoradiography of thymidine kinase-positive and thymidine kinase-negative herpes viruses. *J. Clin. Microbiol.* 17:122-127, 1983.
  13. Tenser, R.B., S.J. Ressel, F.A. Fralish and J.C. Jones: The role of pseudorabies virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection. *J. gen. Virol.* 64:1369-1373, 1983.
  14. Van Oirschot, J.T. and A.L.J. Gielkens: Some characteristics of four attenuated vaccine virus strains and a virulent strain of Aujeszky's disease virus. *Vet. Quarterly* 6:225-229, 1984.
  15. Van Oirschot, J.T. and A.L.J. Gielkens: In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to vaccinated sows. *Am. JVR* 45: 567-571, 1984.

### The pathogenicity and immunoprotective Efficacy of TK<sup>-</sup> Deficient mutants of Pseudorabies Virus.

M.H. Jong, T.H. Liu, I.P. Chan, T.F. Chiou, C.W. Chi.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

#### Summary

The pathogenicity of 3 local isolates of pseudorabies virus, named P7, TNL and C2A, were analysed after passaging 14 times in LTK-cells with BUdR. Results indicated that P7 and C2A were still highly virulent to day-old chicks. On the other hand, the pathogenicity of TNL was greatly reduced and became avirulent after 7 more passages with ara-T. This TK-negative mutant could not replicate in the medium containing HAT. Furthermore, the TK-negative mutant could not be recovered from brain, trigeminal nerve and some other organs of pigs inoculated either intramuscularly or intranasally.

The pathogenecity of the 21st passaged TK-mutant of TNL strain to 1-week-old suckling piglets was also studied. Results showed that it was avirulent, no latency was found. All vaccinated pigs survived and all sentinel and control pigs were killed when they were challenged with a virulent strain 45 days after vaccination. Average periods of fever, virus shedding after challenge and neutralizing antibody response before challenge indicated that intramuscular vaccination could induce better protection than intranasal vaccination.