

皮內遲發型過敏性反應作為豬 假性狂犬病之診斷法

鍾明華 賴秀穗

豬假性狂犬病毒以細胞增殖後，經濃縮及加熱處理製成抗原，注射於病毒感染豬下眼瞼皮下，可引起強烈之反應，由組織病理變化證實為遲發型過敏性反應。未感染豬對病毒及細胞抗原均無任何反應。免疫擴散試驗、血清中和試驗及皮內反應三者間之相關性，由野外試驗成績顯示免疫擴散及皮內反應之敏感性甚高且幾近一致。以蛋白消化酶處理病毒感染細胞所獲之抗原非常適宜免疫擴散試驗，沉降線清晰而單純。

豬隻一旦感染豬假性狂犬病毒 (PrV) 後，因病毒病原性之強弱及豬年齡之不同，其臨床症狀差異甚大，有些豬不呈任何症狀，但可能成為潛在性帶毒者⁽⁵⁾，在某些緊迫及藥物刺激下，排出病毒，構成感染源⁽¹⁴⁾。為了檢出帶毒豬隻，血清中和抗體測定及更簡易之免疫擴散試驗固可資利用，但若能發展出一種直接在豬場使用，更迅速獲知結果之診斷方法，將是更理想而為目前所需之目標。

遲發型過敏性反應 (Delayed type hypersensitive reaction, DTH) 早被應用於人的疱疹病毒⁽¹¹⁾、牛傳染性支氣管肺炎⁽³⁾及雞馬立克病⁽⁴⁾之診斷，而牛結核菌素反應更是早已熟知者。1967年 Haralambiev 等⁽⁷⁾始應用於豬假性狂犬病之研究；1977年 Smith⁽¹⁴⁾更配合組織病理變化對豬假性狂犬病的過敏性反應進一步研究；1978年 Scherba 等⁽¹²⁾以不同的方法來處理 PrV 做成反應用抗原，並檢討其效果。本試驗仍採濃縮病毒做成抗原，於實驗室配合組織病理變化、中和抗體測定及免疫擴散等試驗研討其反應，然後使用於野外豬場，以評估其效力。

試驗材料及方法

抽印自：中華民國獸醫學會雜誌 8:151-154, 1982

細胞培養：所有抗原的製備及中和試驗等所使用的細胞均為 RK-13 株化細胞。細胞培養液為 Eagle's MEM, 加有 8% calf serum、100 u/ml penicillin、100 μg/ml streptomycin 及 2.5 μg/ml fungizone。

病毒：供試病毒為 PrV-TNL 株，係由本省仔豬病例分離所得。

皮內反應抗原製備：RK-13 細胞於迴轉瓶內形成單層後，倒棄培養液，將病毒接種之，經 37°C、60 分鐘吸着後，將病毒液抽棄之，再加入不含血清之 MEM 維持液，繼續培養於 37°C 暖房內。當 CPE 將近完成時，即將感染細胞連同維持液凍結，解凍一次，再以 sonicator 處理 60 秒，後以 3,000xg 離心 20 分鐘，收集上清液，再依 Gutekunst 等法⁽⁶⁾，每 100 ml 病毒液中加入 42.5 gm 之 (NH₄)₂SO₄，於 4°C 冰箱中攪拌一夜，翌晨以 2,000xg 離心 30 分鐘，以蒸餾水溶解沉澱物質，再置於 cellulose 透析袋內，先以蒸餾水透析，至外膜無 (NH₄)₂SO₄ 為止，後以分子量 20,000 之 PEG 行膜外濃縮，至原病毒液量之 1/80，然後再以 PBS 透析一夜，翌晨取出再經 56°C、3 小時不活化後作為抗原。

細胞抗原製備：依上法取未接種病毒之

RK-13細胞製取之。

動物接種：6週齡無Pr抗體小豬，以鼻腔內接種方式給予 $10^{5.0}$ TCID₅₀之PrV-TNL株病毒。分別接種於3、7及14天後各取一頭採取血液、分離血清，然後將0.1ml病毒抗原注射於一側下眼瞼皮下及尾根部皮下；細胞抗原則注射於另一側下眼瞼皮下。24小時後判定，判定時只要有紅腫現象即視為陽性，48小時後分別予以撲殺，取下眼瞼部分組織作病理檢查。野外實驗時亦將同量（0.1ml）病毒抗原注射於下眼瞼皮下，同樣亦在24小時後判定。

免疫擴散抗原製備：依Pfeiffer等⁽¹⁰⁾法，略加修改後實施之。亦即將病毒感染之RK-13細胞，當CPE行將完成時，震盪迴轉瓶，使細胞完全脫離瓶壁，以3,000 xg離心20分鐘，捨棄上層液，加入適量之Trypsin-versene (TV)液於細胞沉渣中，以Sonicator處理20秒，於37°C攪拌3小時，先以4,000 xg離心30分鐘，再以110,000 xg離心1小時，將完整之病毒顆粒及nucleocapsid除去，上層液即為免疫擴散用可溶性抗原。

免疫擴散試驗 (MIDT)：依賴等⁽¹⁾及鍾等⁽²⁾法實施之。

微量血清中和試驗：2倍稀釋血清0.02ml與等量含100 TCID₅₀病毒液於微量滴定盤中混合，於37°C，60分鐘感作，然後加入0.05ml含250,000細胞/ml之RK-13細胞混懸液，再以膠紙封貼，置於37°C暖房中，72小時後判讀。

結 果

無抗體小豬鼻腔內接種 $10^{5.0}$ TCID₅₀病毒，14天後將皮內反應抗原0.1ml注入一側下眼瞼皮下，24小時後即產生十分強烈的紅腫（圖1）；與未注射的另一側相形之下，益見其反應（圖2）。另外亦將同量抗原注入尾根部皮下，其反應則稍弱（圖3）。未接種豬對病毒及細胞抗原均無反應。

濃縮皮內反應抗原於南、北部某三豬場應用結果，0.1ml抗原注射於種豬下眼瞼皮下，共89頭，同量抗原亦同時注入於部份種豬尾根部皮下。在抗原注射前採血、分離血清，實施中和試驗及免疫擴散試驗，三者間之相關性顯

示於表1；皮內反應與免疫擴散試驗所得成績幾近一致。當中和抗體為1：8或以上時，免疫擴散試驗全為陽性，皮內反應僅有一例未呈陽性；中和抗體為1：4者有18例，免疫擴散及皮內反應陽性者各為15及14例。

病毒感染細胞經TV處理所獲之可溶性抗原與抗體所形成之沉降線單純而清晰（圖4），較 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃縮所得之抗原為明顯，而抗原製取量亦較豐，雖然二者之敏感性無甚差異。

討 論

遲發型過敏性反應為細胞免疫之指證之一，而細胞免疫在假性狂犬病中之重要性已為研究者所確認⁽¹³⁾，為了測定過敏性反應之特異性，未感染及感染豬隻均以病毒及細胞抗原注射之，未感染豬對兩種抗原皆無反應，而感染豬則僅對病毒抗原起強烈的反應，由此可知過敏性反應之特異性，更由其他兩種血清學反應的指證下而不容懷疑。Scherba等⁽¹²⁾認為所有DTH陽性者，其中和抗體均為 $\geq 1:4$ ，且無誤判之情形，但其所獲之DTH陽性率僅及中和抗體陽性率之一半。本試驗所得之DTH則高達77.8%（14/18），當中和抗體為1：4時，檢出率差異甚大。推測Scherba等⁽¹²⁾所使用之抗原未經濃縮，又由本試驗中所引起之強烈反應，本抗原當含有高量之病毒特異性抗原物質，可使低感染狀態之豬產生反應。

抗原注射部位對反應之影響，Smith等⁽¹⁴⁾認為下眼瞼皮下最為方便，也易判決；Scherba等⁽¹²⁾則認為尾根部最為簡易可行。本試驗認為下眼瞼皮下注射所引起之反應比尾根部明顯，惟於注射抗原時，應小心從事，以免傷及眼球。

由於皮內反應可直接應用於農場，且反應快速，可及早摘除感染豬隻，有利於本病之控制。又由於此抗原僅能使曾經被感染之豬隻引起遲發型反應，故可實以區別被動性免疫。

以蛋白酶處理感染細胞可獲得良好的免疫擴散抗原，此乃因Herpesviruses侵入細胞後，在細胞質中合成大量的醣蛋白（glycoproteins）然後再融入（incorporate）核膜及細胞膜（cell membrane）中，當病毒

nucleocapsid 由核內 budding 時即從核膜或細胞膜取得病毒特異性醣蛋白，構成 envelope (8)。病毒封套上及細胞核膜上之醣蛋白可用多種方法溶解下來，蛋白消化酶即為其中之一，

表一 豬假性狂犬病中和抗體微量免疫擴散及皮內反應之相關性

中和抗體價	血清數例	免疫擴散陽性數	皮內反應陽性數
< 1 : 4	30	0	0
1 : 4	18	15	14
1 : 8	23	23	22
1 : 16	14	14	14
≥ 1 : 32	4	4	4

(9)，如此所獲得之抗原，雖經超高速離心 110,000 xg，并不影響其效果，故可知其為可溶性抗原，此抗原之敏感性 (83.3%) 與 (NH₄)₂SO₄ 濃縮所獲之抗原之敏感性 (82.4%) 雖無差異，但以蛋白消化酶處理所獲之抗原量多，沉降線率一而清晰。鑒此，若能改用可溶性抗原做為皮內反應抗原，以取代濃縮加熱不活化抗原，當可提高皮內反應之敏感性及安全性。

誌 謝

本試驗承蒙農發會之經費補助，又蒙農發會林博士再春之指導與鼓勵，使本試驗得以完成，謹申謝忱！亦向台北縣及屏東縣家畜疾病防治所同仁之協助致謝。



圖 1：濃縮 Pr 抗原注射 24 小時後，下眼瞼紅腫情形。

Positive reaction shown by swollen orbit formed 24 hours after subcutaneous injection with concentrated PrV antigen.



圖 2：正常下眼瞼。

Fig 2. Normal eyelid.



圖 3：抗原注射 24 小時後，尾根部之陽性反應。

Positive reaction 24 hours after antigen inoculation at the left base of tail.

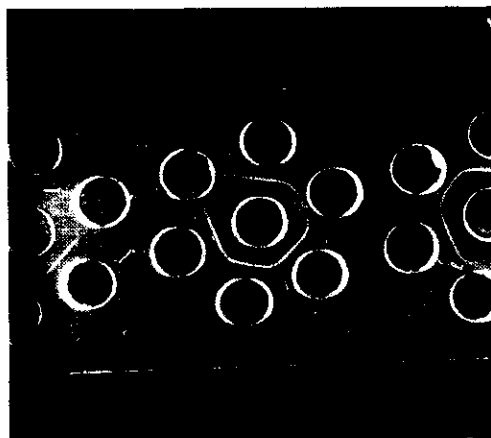


圖 4：豬假性狂犬病抗原與豬血清之免疫擴散反應。

Microimmunodiffusion reactions between PrV antigen and swine serums.

參考文獻

1. 賴秀穗, 1978。簡介平皿瓊脂免疫擴散法應用於疾病之診斷。動物醫學, 2:40-42。
2. 鍾明華, 賴秀穗, 1979。微量免疫擴散與中和試驗對豬假性狂犬病血清抗體測定比較。中華民國獸醫學會雜誌, 5:67-70。
3. Darcel, C, LE Q. and W. J. Dorward. 1972. Skin reaction and infectious bovine rhinotracheitis. *Can Vet. J.* 13: 100-102.
4. Dawe, D. E., J. Byerly, J. Brown and R. B. Davis. 1971. Skin test for the detection of Marek's disease infected chicken. *JAVMA*. 158:1908.
5. Gutekunst, D. E. 1979. Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. *AJVR*. 40:1568-1572.
6. Gutekunst, D. E., C. Pirtle and W. L. Mengeling. 1978. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibody to pseudorabies virus in swine serum. *AJVR*. 39:207-210.
7. Haralambiev, H. and M. Potov. 1967. An allergy in the Aujeszky disease of swine. *C. r. Acad. bulg. Sci* 20: 853-854.
8. Heine, J. W., P. G. Spear and B. Roizman. 1972. Proteins specified by herpes simplex virus. VI. Viral proteins in the plasma membrane. *J. Virol.* 9:431-439.
9. Helenius, A. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 415:29-79.
10. Pfeiffer, N. E. and I. A. Schipper. 1979. Evaluation of pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. *AJVR*. 40:595-598.
11. Rose, H. M. and E. Mollary. 1947. Cutaneous reaction with the virus of herpes simplex. *J. Immuno.* 56:287-294.
12. Scherba, G., D. P. Gustafson, C. L. Kanitz and P. L. Son. 1978. Delayed hypersensitivity reaction to pseudorabies virus as a field diagnostic test in swine. *JAVMA*. 173:1480-1493.
13. Skoda, R., I. Brauner, E. Sadecky and J. Somogyiova. 1964 b. Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. II. Immunization of pigs under laboratory condition. *Acta virol., Prague* 8:123-134.
14. Smith, P. C. and W. L. Mengeling. 1977. A skin test for pseudorabies virus infection in swine. *Can. J. Comp. Med.* 41:364-368.

**Cutaneous Delayed-type Hypersensitive Reaction as a Diagnostic
Test for Pseudorabies Virus Infection in Swine**

M.H. Jong and S.S. Lai

SUMMARY

Severe reaction was seen by subcutaneous injection with concentrated and heat-inactivated PrV antigen into lower eyelid of swine. This reaction was verified as delayedtype hypersensitive reaction by histopathological changes. Nonexposed control pigs did not react to the viral and cellular antigens at all. The correlation among serum neutralization, microimmunodiffusion, and skin tests was analysed. The results indicated that the sensitivities of the latter two tests were pretty high and similar to each other. The antigens obtained by treating the infected cells with proteolytic enzyme were suitable for microimmunodiffusion test.