

鴨隻假性狂犬病病毒之人工感染試驗

劉培柏

60 隻 4 週齡鴨分成 3 組，每組 20 隻，分別經口鼻、腦內及肌肉接種豬假性狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 臺南分離株 400 TCID₅₀，證明以腦內及肌肉接種可使其感染發病，而口鼻接種則否。感染發病鴨隻的臨床症狀，只顯現中樞神經症狀，包括沉鬱、頭頸的不正常活動、抽搐、昏迷，繼則猝然而死。接種 PRV 的鴨隻並不發生搔癢。感染發病或斃死的鴨隻大體剖檢，可見腦的出血點病變，且腦組織病理學檢查，可檢出非化膿性圍管性腦炎及瀰漫性神經膠質細胞增生等病變。除了感染發病或斃死鴨隻腦乳劑可分離出病毒外，所有供試動物的臟器乳劑、血清、口鼻分泌物及共泄腔內容物都未能檢出病毒，血清也未能測出對 PRV 的中和抗體。由結果猜測，鴨隻雖以口鼻接種未能感染，而經腦內或肌肉注射接種會發病，且顯然以腦為病毒感染的主要器官 (Main organ)，但並非為帶原者 (Reservoir) 也不傳播病原，對於豬假性狂犬病所扮的傳播角色並不重要。

本省豬假性狂犬病 (Pseudorabies, PR) 於 1971 年 7 月首次發現於屏東地區，^(6,15) 疫勢頗熾，到目前本病仍繼續蔓延，對養豬事業的危害甚大。本病之散播途徑，除明瞭其藉帶毒豬隻之移動及運輸工具的污染外，有關疫學方面的資料很少，⁽³⁾ 而出沒於豬場的野生動物如鼠類，對本病的傳播已證明並不重要。^(7,8) 本省養豬場，常以漁牧混合經營，因此常見水禽如鴨隻，以放飼方式飼養於豬場內。禽類於豬假性狂犬病傳播上所扮的角色，目前仍不清楚。⁽³⁾ 本試驗則以鴨隻人工感染該病毒，詳細觀察其臨床反應及檢測排毒之可能性，除可究明其對 PR 病毒的感受性外，並對豬假性狂犬病防疫上的控制有所裨益。

材料及方法

鴨隻：

4 週齡體重 250 g 左右土番鴨 60 隻，由宜蘭養鴨中心購回，隨機分成 3 組，每組 20 隻，分別供口鼻、腦內或肌肉接種 PR 病毒之用。

PR 病毒：

PR 病毒 TNL 株，⁽⁴⁾ 係由臺南地區罹患本病豬隻腦乳劑分離所得，經以 RK 13 株化細胞 (Rabbit kidney cell line) 增殖，病毒力價為 10⁷ TCID₅₀ / ml。

病毒之接種：

試驗鴨隻分成 3 組，每組 20 隻，以供口鼻、肌肉及腦內接種病毒，接種之病毒量為 10⁴ TCID₅₀。

接種後的臨床反應觀察及試材採集：

鴨隻接種病毒後觀察 2 週，詳細記錄臨床反應症狀。所有試驗鴨隻每天以棉花拭子採集口鼻分泌物及共泄腔內容物，再將拭子浸於 2 ~ 5 ml 含 2% 胎牛血清的 MEM (Minimal essential medium) 組織培養液中，以 1500 RPM 遠心取上清液，再經 0.22 μm 微孔膜濾過。將處理過的試材置 - 70°C 中保存，作病毒之檢測用。發病頻死的鴨隻，則以心臟穿刺作血清之採集，部份血清立即保存於 - 70°C 中，作病毒檢測用；部份則置 56°C 中 30 分鐘不活化，供 PR 中和抗體測定。鴨隻大體剖檢，記錄

病變後，包括腦組織等的臟器病材（肝、肺、腎、胰、脾、滑氏囊、和小腸等），部份以10%甲醛—磷酸緩衝液固定後，作組織切片，以蘇木紫—伊紅（Hematoxylin-Eosin）染色後鏡檢；部份病材以含2%胎牛血清的MEM組織培養液作成10%的乳劑，供病毒檢測用。病毒接種後2週，所有存活的鴨隻，放血屠殺，如上述之法採集試材。

病毒之分離：

以含10%胎牛血清的MEM組織培養液，將RK 13株化細胞培養於24洞的平板上*，經3~4天形成單層細胞後，去除培養液，將血清試材、經濾過處理的口鼻分泌物及共泄腔內容物、或腦組織等的臟器病材乳劑上清液0.1ml接種於單層細胞上，每件試材接種2洞。置於37°C中感作1小時，再以不含血清的MEM組織培養液清洗單層細胞兩次，最後每洞注加1ml含2%胎牛血清的培養液。將平板放於密封容器，置37°C恆溫室中，每天觀察有無細胞變性（Cytopathic effect）發生，連續5天，作為病毒分離之評估。

PR中和抗體測定：

依鍾⁽⁴⁾報告之微量血清中和抗體測定法實施。用96洞微量培養平板**，以半自動微量稀釋器⁺作2倍稀釋法將被檢血清試材及標準對照血清⁺⁺以培養液稀釋後，每洞加入等量（0.05ml）病毒液，含病毒量為200 TCID₅₀，於37°C中感作1小時，再加入RK 13細胞懸浮液約含10⁵細胞，以膠紙覆蓋，置37°C中，3天後觀察細胞變性，並以Spearman-kärler法計算其抗體力價。

試驗結果

鴨隻以腦內或肌肉接種病毒，第3天即開始發病，2組鴨隻發病的時間，並無顯著的差

別，而後陸續斃死，接種後7天內全部死亡。呈顯著的臨床症狀，依病程為沉鬱，不正常的摔頭、曲頸動作（圖1）、伏臥、抽搐、昏迷、而後猝然死亡。發病鴨隻不發生搔癢的症狀。大體解剖觀察，除腦可見出血點外（圖2），其他臟器並無肉眼可見的病變。腦組織病理學檢查，可見大腦皮層之皮質部呈明顯之血管周圍細胞浸潤（Perivascular cuffing）及瀰漫性神經膠質細胞增生現象（Gliosis）（圖3）。口鼻接種病毒的鴨隻，於2週的觀察期間，並無不良反應而健存。

大部份感染發病或斃死的鴨隻，都可由腦乳劑分離到病毒，肌肉接種組為16隻（80%），腦內接種組為18隻（90%）。但由肝、肺、腎、胰、脾、滑氏囊、小腸等臟器的乳劑或血清、口鼻分泌物及共泄腔內容物，都未能檢出病毒。口鼻接種病毒組的鴨隻，於採集的所有試材，包括腦乳劑，都未能檢測出病毒。

所有3組供試鴨隻血清，都未能檢測出對PR病毒的中和抗體。

討 論

豬假性狂犬病之自然感染病例或實驗感染等之研究證明，該病毒主要為經由呼吸道及消化道感染，^(3,10,11)而由本試驗結果顯示鴨隻雖以口鼻接種病毒雖不能感染，但經以注射接種，可使其發病而斃死。臨床症狀顯示嚴重的神經系統的障礙，除腦外之臟器乳劑、口鼻分泌物或共泄腔內容物都無病毒的檢出，因此縱使發病的鴨隻在豬場內也不是傳染源。因由於腦乳劑可檢出病毒，而豬隻對10 TCID₅₀的低病毒量就會感染，⁽¹⁾所以豬隻雖有誤食發病鴨隻屍體而感染的可能性，但目前仍無鴨隻自然感染發病的病例報告，此種疑慮當可排除。

豬隻經口鼻或以注射接種病毒，有時於臟

*Costar, Tissue culture cluster, 24 wells 16 mm well diameter radiation sterilized, Cambridge, Mass. USA.

**Nunclon, 96 wells plates, Denmark.

⁺Delta, Titertek multidiluter, Flow lad, USA.

⁺⁺PRV control serum, kindly supplied by Dr. E. C. Pirtle, National Animal Disease Center, Iowa, USA.

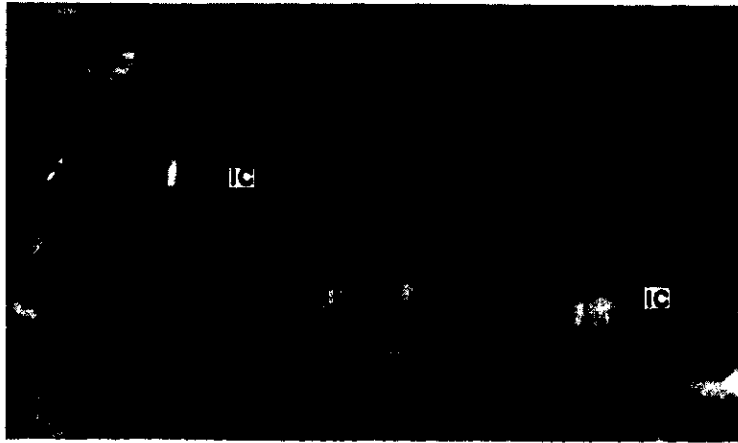


圖 1 鴨隻經肌肉 (IM) 或腦內 (IC) 接種 P R 病毒後第 4 天，呈顯著不正常的頭頸動作。



圖 2 經肌肉接種 P R 病毒之發病鴨隻，大體剖檢，其大、小腦可見出血點病變。

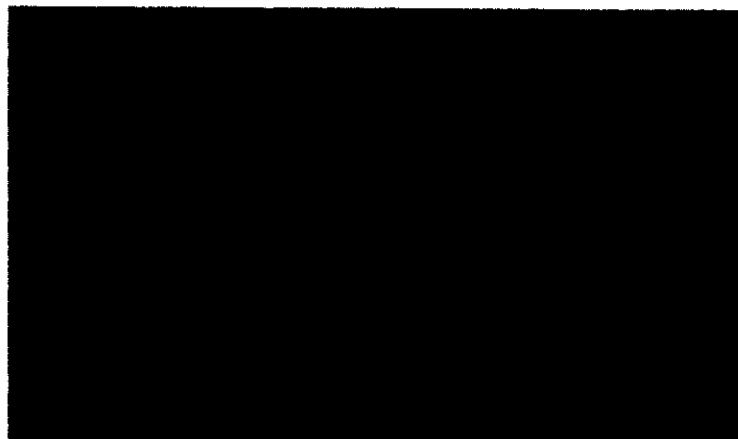


圖 3 經肌肉或腦內接種 P R 病毒發病鴨隻，大腦皮層之皮質部明顯之血管周圍細胞侵潤 (Perivascular cuffing) 及瀰漫性神經膠質細胞增生 (Gliosis) 。

器雖也會發現病變，但主要都是因侵入中樞神經系統而致發病斃死，^(3,12,16)其他於家畜禽也有類似的報告。^(2,5,9,13)於本試驗中，鴨隻以肌肉或腦內注射病毒，發病鴨隻除腦外，臟器都無病變可見且無病毒的檢出，臨床症狀也只呈現中樞神經的障害，由此猜測PR病毒對鴨隻以腦為其感染增殖的主要器官(Main organ)。

目前已明瞭不顯性感染帶毒豬隻的排毒是重要的傳染源，其他的家畜或野生動物在本病傳播上所扮的角色，尚有爭論。^(3,7,14)Mares等⁽⁷⁾報告指出出沒於豬場的鼠類，對本病的傳播並不重要；乃因為鼠類經以口鼻接種病毒有較強的抵抗力，且由接種耐過鼠的組織不能檢出病毒，血清也無中和抗體的產生。Wright等⁽¹⁴⁾指出野生動物浣熊雖可由口服接種高劑量病毒而發病斃死，且可由腦及扁桃腺拭子分離出病毒，但由耐過動物則未能檢出病毒且無中和抗體的產生，而認為其非長期性的傳染源。由本試驗結果得知，鴨隻經口鼻接種PR病毒，並不能使其感染發病，且由組織中也未能檢出病毒，亦無排毒及無中和抗體產生，當可證明鴨隻為非帶原者(Reservoir)也不傳播病原，於豬假性狂犬病所扮的傳播角色並不重要。

參考文獻

1. Baskerville, A. 1972. The influence of dose of virus on the clinical signs in experimental Aujeszky's disease in pigs. *Br. Vet. J.* 128 : 394 - 400.
2. Beasley, V.R., R.A. Crandell., W.B. Buck., R.W. Ely and J.P. Thilsted. 1980. A clinical episode demonstrating variable characteristics of pseudorabies infection in cattle. *Vet. Res. Commun.* 4(2) : 125-129.
3. Gustafson, D.P. 1981. Pseudorabies in Disease of Swine, Edited by A. D. Leman., R.D. Glock., W.L. Mengeling., R.H.C. Penny., E. Scholl and B. Straw. 5th Edition Iowa State Uni. Press. Ames, Iowa, U.S.A.
4. Jong, M.H. and S.S. Lai. 1979. Comparison of the microimmunodiffusion test and microserum-neutralization test for detection of antibody to pseudorabies virus in swine serum. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.* 5:67-70.
5. König, C.D.W. 1982. Aujeszky's disease in sheep from a contaminated injection needle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 107(12)475-476. *Abstr. Vet. Bull.* 52:939.
6. Lin, S.C., M.C. Tung., C.I. Liu., C. F. Chang., W.C. Hung and C.M. Cheng. 1972. An outbreak of pseudorabies in swine in Pingtung. *Chinese J. Microbiol.* 5:56-68.
7. Maes, R.K., C.L. Kanitz and D.P. Gustafson. 1979. Pseudorabies virus infections in wild and laboratory rats. *Am. J. Vet. Res.* 40:393-396.
8. McFerran, J.B. and C. Dow. 1970. Experimental Aujeszky's disease (pseudorabies) in rats. *Br. Vet. J.* 126:173-179.
9. Netherlands, Gezondheidsdienst voor Pluimvee. 1982. Aujeszky's disease in chicks. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 107(6) 229. *Abstr. Vet. Bull.* 52:716.
10. Saunders, J.R. and D.P. Gustafson. 1964. Serological and experimental studies of pseudorabies in swine. *Proc. 68th Ann. Meeting U.S. Livestock Sanit. Assoc.* p.256.
11. Shope, R.E. 1934. Pseudorabies as a contagious disease in swine. *Science.* 80:102.
12. Wittmann, G., J. Jakubik and R. Ahl. 1980. Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. *Archives*

- of Virology. 66(3)227-240.
13. Wittmann, G., U. Hohn., F. Weiland and H.O. Bohn. 1981. Experimental intranasal infection of cattle with Aujeszky's virus. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 88(9) 354-357. Abstr. Vet. Bull. 52:124.
 14. Wright, J.C. and D.G. Thawley. 1980. Role of the raccoon in the transmission of pseudorabies: A field and laboratory investigation. Am. J. Vet. Res. 40:581-583.
 15. Yang, J.P.S., P. T. Durfee., C.H. Ma., C.P. Chang and A.E. New. 1972. An epizootic of Aujeszky disease in swine in Taiwan. Virus isolation, identification and seroepidemiological studies. Chinese J. Microbiol. 5:69-75.
 16. Yang, S.Y., C.H. Wang and Y.S. Wu. 1981. Pathologic changes of Piglets inoculated with various titers of pseudorabies virus intravenously. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 7:115-119.

EXPERIMENTAL INFECTIONS OF DOMESTIC DUCKS WITH PSEUDORABIES VIRUS

P. P. Liou

Sixty ducks of 4 weeks old were randomly divided into 3 groups, 20 in each, and were inoculated with 400 TCID₅₀ of pseudorabies virus (PRV) by oronasal, intracerebral and intramuscular routes respectively. Results indicated that all but the ducks in oronasal inoculation group were infected. The major clinical signs were the disturbance of the central nervous system only. Depression, unusual movement of head, convulsions, coma and sudden death were present. Pruritus was not observed in any of the ducks inoculated with PRV. Petechial hemorrhages, marked perivascular cuffing and diffuse gliosis were found in the brains of the infected ducks. All vital organs suspensions, sera, oronasal and cloacal discharges of the tested animals were submitted for isolation of the PRV. It was shown that the virus was only detected in the brain tissues of the infected animals. The sera of all animals did not contain detectable levels of RPV neutralizing antibodies.

The data suggest that the infection of PRV in ducks can be established by intracerebral or intramuscular inoculations and the brain tissues seem to be the main organ for the replication of PRV. The role of the duck in the transmission of PRV is limited; therefore it is not important in either as a reservoir or dissemination of PRV.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tanshui, Taiwan, ROC.