

# 哺乳小豬之假性狂犬病人工被動免疫試驗

賴秀穗 陳忠松 何維莊 黃天祥 鍾明華 王金和

將無假性狂犬病抗體之7~10天齡仔豬42頭約1~2公斤重，分成六組，第1~5組每頭分別以皮下注射2、4、8、16及32ml之假性狂犬病高免血清力價為1024倍，其中第2及5組各為12頭，其餘各組為4頭，第6組為6頭，供對照用，1~5組4頭及對照2頭，血清注射後第2天抽血後各分成二組，一半以1000 TCID<sub>50</sub>之假性狂犬病強毒鼻腔內攻毒，另一半則以接觸感染攻毒。第2及5組每頭分別皮下注射4及32ml血清各8頭，加上對照4頭於血清注射後1及2週各半數豬分別以鼻腔及接觸感染攻毒。攻毒後每日觀察臨床症狀及體溫，如有斃死豬，則以病毒分離及病理切片診斷其死因。

經假性狂犬病高免血清注射後，各組平均中和抗體力價，血清注射2ml組為4倍，4ml為10倍，8ml組為18倍，16ml組為30倍，32ml組為70倍。4及32ml組各留8頭，經一週後其平均中和抗體價分別為10及13倍。但部分豬留做2週後攻毒，因患嚴重下痢而死亡。同組間因豬隻個體大小不同其抗體價亦有差異。攻毒後2.4及8ml組經鼻腔接種攻毒，因假性狂犬病斃死者各一頭，其抗體力價分別為6、12及12倍。其餘各組雖有部分豬隻死亡，但經診斷非因假性狂犬病感染而死，4ml及32ml血清注射組一週後攻毒，結果僅4ml因假性狂犬病感染死亡一頭，其抗體力價為8倍，其餘均健存，對照組均因感染假性狂犬病毒死亡。本試驗結果指出，假性狂犬病高免血清對仔豬之保護頗有效，一般而言，血清注射後，其血清力價在3倍左右即有保護力，但保護率隨個體之不同而有差別，與體內抗體之高低無絕對關係。在體內抗體高於某一倍數如本試驗中之注射16ml組平均抗體價在30倍則無因假性狂犬病死亡之情形，豬隻體中之抗體倍數在10倍左右，對假性狂犬病之保護力，至少可持續一週或一週以上。

豬假性狂犬病引起懷孕母豬的流產，死產，木乃伊化及哺乳小豬的死亡，已成為豬的嚴重疾病(4)。本省於1971年在屏東地區首先發現豬假性狂犬病(PR)，主要引起哺乳小豬之死亡(6)，由於豬隻的移動，PR的散播漸漸由南蔓延到北，目前除少數大豬場外幾乎全省各大豬場都有感染之情形(9)，在本省的危害最初主要引起哺乳小豬的死亡，後來懷孕母豬流產情形增加，甚至引起成豬的死亡，死亡豬隻的解剖病變由最初無任何特殊病變，而演變至今在死亡豬隻常可見內臟如肝、脾之壞死病點及肺臟之出血病變(5)，每年因PR所造成的經濟損失均在數千萬元以上。PR有持續感染的特性，豬場一旦感染就永遠成為污染場，病毒永遠存在該豬場(2)，目前對PR的預防已有活毒及死毒疫苗之應用，疫苗的預防僅能防止臨床症狀病例的發生而無法防止感染(8)，故在污染場PR病毒常存在而造成豬隻的流產及哺乳豬之死亡。對於PR污染場或正在流行之豬場，在野外以PR高度免疫血清來注射哺乳小豬預防PR的感染往往可減少損失(1)。但迄今尚無試驗室之報告關於PR人工被動免疫之試驗資料。本報告即在描述哺乳小豬注射不同量之PR高免血清後，其血清中含有PR抗體之量，持續時間及對PR強毒之保護力。

## 材料及方法

病毒：PR野外分離毒，由感染PR而死之哺乳小豬腦以MVPK(豬腎細胞株)細胞分離並經2

代增殖，力價高達 $8.5TCID_{50}/ml$ 。此分離毒供作強毒攻擊用。

細胞：MVPK 豬腎細胞株，由美國梅島動物疾病中心分讓。供為病毒分離及中和抗體測定用。

豬假性狂犬病高免血清之製造，以假性狂犬病死毒疫苗免疫八週仔豬後 2 週再以鼻腔內注 PR 強毒 $2ml$  (力價為  $8.5TCID_{50}/ml$ )，再經 2 週分別以  $25ml$  之 PR 強毒以血管及腹腔內注射後每週採血測定中和抗體力價，至 4 週後中和抗體力價達 1024 倍。經放血分離血清並經  $56^{\circ}C30$  非熱化後即為供試之高免血清。

動物及接種方法：無 PR 抗體之 7~10 日齡仔豬 42 頭，每頭約重 1—2 公斤，分成六組，第 1~5 組每頭分別以皮下注射 2、4、8、16 及 32ml 之 PR 高免血清 (力價為 1024 倍)，其中 2 及 5 組各為 12 頭，其餘各組為 4 頭，第 6 組 6 頭，供為對照用，1~5 組 4 頭及對照 2 頭，於血清注射後第 2 天抽血後各分成二組，一半以  $1000TCID_{50}$  之 PR 強毒鼻腔內攻擊，另一半則以接觸感染方式攻毒。第 2 及 5 組每頭分別皮下注射 4 及 32ml 血清各 8 頭，加上對照 4 頭於血清注射後 1 及 2 週各半數豬分別以鼻腔及接觸感染攻毒。攻毒後每日觀察臨床症狀及體溫，如有斃死者，則以病毒分離，螢光抗體冷凍切片法，及病理切片診斷其死因。其試驗設計如表一。

表一 仔豬頭數及接種分配法

組別	豬頭數	血清注射量 (ml)	血清注射後不同時間攻毒頭數		
			1天	7天	14天
1	4	2	4	0	0
2	12	4	4	4	4
3	4	8	4	0	0
4	4	16	4	0	0
5	12	32	4	4	4
6	6	0	2	2	2

微量中和抗體測定法：PR 中和抗體測定法，採用微量測定法 (10)，用 96 個洞微量培養板，以半自動微量稀釋機 (美國 Flow 公司出品)，2 倍稀釋法將被測血清以 MEM 培養液 (美國 GIBCO 出品) 稀釋後每洞加入等量 (0.05ml) 病毒液含  $100TCID_{50}$ ，中和感作一小時後再加入 MVPK 細胞懸濁液約含  $1 \times 10^5$  個細胞，後以膠紙覆蓋置  $37^{\circ}C$  培養，3 天後觀察細胞病變，並以 Spearman Kärber 法計算其抗體力價。

螢光抗體冷凍切片法：將所有試驗中死亡豬隻之腦及扁桃腺，切成一公分左右之方塊組織置於冷凍切片機內凍結後切成  $6 \sim 9\mu$  厚之薄片，再經冰冷之丙酮固定後以 PR 螢光染色液直接染色法，其法如林等之報告 (7)，再以螢光顯微鏡觀察特異螢光。

## 結 果

經 PR 高免血清注射後同組中因豬隻個體大小不同其抗體力價差異甚大，各組平均中和抗體力價，注射血清 2ml 組為 4 倍 ( $3 \sim 6 \times$ )，4ml 組為 10 倍 ( $4 \sim 32 \times$ )，8ml 組為 18 倍 ( $8 \sim 32 \times$ )，16ml 組為 30 倍 ( $12 \sim 64 \times$ ) 32ml 組為 70 倍 ( $64 \sim 128 \times$ )，4 及 32ml 組各留 8 頭，經一週後其平均中和抗體力價為 10 倍 ( $6 \sim 16 \times$ ) 及 13 倍 ( $8 \sim 16 \times$ )。部分豬預定留作 2 週後攻毒，因人工餵飼而患嚴重下痢死亡，故使試驗頭數不足無法照預定試驗於 2 週後攻毒。注射血清後各組及對照組小豬攻

擊PR強毒僅在注射1天及7天後行之。其結果如表二所示。

表二 哺乳仔猪注射PR高免血清後強毒攻擊後耐過之效率

注射血清量 (ml)	猪隻頭數	血清注射後不同時間攻 毒前血清抗體平均力價		耐過頭數	死亡頭數	
		1天	7天		非PR	PR
2	4	4		1	2	1
4	4	10		1	2	1
4	4		10	3	0	1
8	4	18		1	2	1
16	4	30		2	2	0
32	4	70		2	2	0
32	4		13	4	0	0

※以病毒分離及病理組織切片證明。

攻毒後2, 4及8ml組經鼻腔接種攻毒, 因PR斃死者各1頭, 其抗體力價分別為6, 12及12倍。非PR斃死者各有2頭。16及32ml組攻毒後耐過者各有2頭非因PR斃死者各2頭, 但無因PR而死者。4及32ml血清注射組一週後攻毒, 結果僅4ml組因PR感染死亡者一頭, 其抗體力價為8倍。其餘均健存, 所有對照組均因感染PR呈典型症狀而死亡。

## 討 論

本試驗哺乳小豬日齡均在10天以下, 因以人工哺乳甚易罹患大腸桿菌症死亡, 試驗結果若將非PR死亡之仔猪均視為攻毒後耐過時則由結果指出PR高免血清對哺乳仔猪之保護頗有效, 血清注射2, 4及8ml組之保護率均為75%, 而16ml以上二組則為100%。Crandell等(1)曾應用PR高度免疫血清做PR感染場之哺乳小豬緊急預防可減少哺乳仔猪死亡率分別達28%之多。他們所用之高免血清力價為316倍每頭注射5ml血清。Hill等(3)亦曾以PR高免血清力價256及512倍每頭5ml注射1日齡哺乳小豬後以強毒攻擊而得保護效達50%, 本試驗所用免疫血清力價為1024倍, 而且所測之力價因各實驗室之不同無法比較, 但由試驗結果大致上而言被注射小豬含血清抗體量愈高, 則其保護力愈高。Hill等並未指出哺乳小豬注射高免血清後之豬隻血清中之抗體力價。本試驗發現由於個體之大小差異甚大, 若小豬體液為體重之十一分之一計算則1公斤之小豬應含有體液77ml, 若注射2ml之高免血清(1024倍力價)約等於稀釋77倍, 最終血清之體體力價應為26倍左右, 體重為2公斤者應為13倍左右, 但本試驗注射2ml組, 最終血清力價甚低僅為4倍與理論差異甚大, 未知何種原因。但一般而言注射後血清力價在3倍左右即有保護作用, 但保護率隨個體而異, 與體內抗體之高低無絕對關係, 但在體內抗體高於某一倍數如本試驗中之注射16ml組平均抗體在30倍以上者攻毒後則無因PR死亡之情形。而豬隻血清抗體之倍數在10倍左右, 對PR之保護力至少可持續一週或以上。

PR高免血清雖對哺乳小豬之保護力甚高但應用於野外感染場之可行性, 應視有無足夠血清之供應及經濟價值而定更應認清之事實為, 此種被動免疫僅能預防豬隻無臨床症狀之產生無法預防病毒之感染, 換言之無法清除PR病毒之污染, 而且應用高免血清預防必須在病毒未感染豬之前, 如在感染PR之後應用血清治療則無效(3)。

參 考 文 獻

1. Crandell, R. A. et al. 1977: Use of pseudorabies hyperimmune serum in naturally occurring pseudorabies in Illinois wine herds. JAVMA. 171 : 59—63.
2. Gustafson, D. P. 1974. Pseudorabies in Diseases of Swine, Edited by H. W. Dunne and A. D. Leman. 4th Edition. Iowa State Uni. Press. Ames, Iowa, U. S. A.
3. Hill, H. T. and R. D. Glock 1976. The efficacy of pseudorabies antiserum prophylaxis in sucking pigs. In Proceedings. International Pig Veterinary Society, Ames, Ia : G7.
4. Howarth, J. A. and DE PAOLI, A. 1968. An enzootic of pseudorabies in swine in California, JAVMA' 152 : 1114.
5. Kluge, J. P. and C. J. Mare, 1976. In Proceedings. International Pig Veterinary Society. Ames, Iowa. G3.
6. Lin, S. C., M. C. Tung, C. I. Liu, C. F. Chang, W. C. Huang and C. M. Cheng. 1972. An outbreak of pseudorabies in swine in Pingtung. Chinese J. Microbiol. 5 : 56—68.
7. Lin, T. C., S. S. Lai Y. C. Cheng, C. M. Shieh, Y. C. Chen, C. C. Chen, C. S. Lee and Y. S. Wu. 1969. Studies of the fluorescent antibody technique for hog cholera diagnosis. Exp. Report of Taiwan Provincial Research Inst. for Animal Health. 6 : 23—32.
8. Personal Communication, Unpublished data.
9. Personal communication with Veterinary Officer in Provincial Department of Agriculture and Forestry of Taiwan. 1979.
10. Schmidt, N. J., E. H. Lemmette and M. F. Hanshoe, 1966. A micromethod for performing paramfluenza virus neutralization tests. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122 : 1062—1067.

## Passive Immunity of Pseudorabies in Suckling Pigs

Shiow S. LAI, C. S. CHEN, W. C. HO T. H. HWANG

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Forty-two piglets free of antibody against pseudorabies virus (PrV) aged 7—10 days and each weighted 1 to 2kg were divided into six groups. Five groups of piglets were subcutaneously inoculated with 2, 4, 8, 16 and 32 ml of PrV porcine antiserum with a titer of 1:1024 respectively. Each group contained 4 piglets except two groups receiving 4 and 32ml of antiserum having 12 piglets in each. Another group contained six piglets served as control. Four of each tested group and 2 of control group separated into even number were challenged with local isolate of virulent PrV (1000 TCID<sub>50</sub>) via intranasally and contact infection respectively in the following day. The rest of 8 piglets in each group receiving 4 and 32 ml of antiserum were also challenged at one and two weeks post inoculation with antiserum. Pre-inoculation and prechallenge serum were collected. Clinical signs and rectal temperature were recorded daily. All dead piglets were subjected to virus isolation and brain histopathology examination in order to prove their causative agent.

Piglets receiving same amount of antiserum showed varied levels of serum neutralizing antibody titers in different individuals. In average, level of 1:4, 1:10, 1:18, 1:30 and 1:70 were found respectively in the piglets receiving 2, 4, 8, 16 and 32ml of antiserum in the following day after inoculation. Two groups of 8 piglets in each receiving 4 and 32 ml of antiserum showed an average titer of 1:10 and 1:13 respectively at one week after inoculation with antiserum. However, some piglets in these two groups died from severe diarrhea resulted in insufficient number of piglets to keep two weeks long for the test. One of each in 2, 4, and 8 ml of antiserum inoculated piglets died from PrV infection after intranasal challenge. Their serum antibody titers before challenge were 1:16, 1:12 and 1:12. Although some other piglets in different groups died after challenge. PrV infection was not detected. 4 piglets in each receiving 4 and 32 ml antiserum respectively and 1 control piglet challenged with virulent PrV 1 week post inoculation with antiserum survived normally except one receiving 4ml of antiserum having a titer of 1:8. All control piglets died from PrV infection.

Conclusively, piglets receiving hyperimmune serum showed good protection against PrV challenge even with a low titer of 1:3. However, protection rate varied from one piglet to another. The data did not clearly indicate that certain levels of serum antibody titer would positively protect the piglets from challenge. But all piglets receiving 16ml or more antiserum showed a titer higher than 1:30, and did not die after challenge. Piglet having antibody titer of 1:10 showed protection against PrV at least longer one week.