

臺灣之鴨和鵝對新城雞瘟病毒 之疫學及其感染態度

II 鴨和鵝體內病毒增殖，分佈排泄及抗體消長

楊 揚 輝

（臺灣省家畜衛生試驗所）

對鴨和鵝進行新城雞瘟病毒（Newcastle Disease Virus, NDV）感染實驗，探討病毒之體內分佈，排泄及抗體之消長。

以 NDV 佐藤株接種於鴨，檢討其體內分佈結果，接種鴨在 6 小時以後病毒開始出現，至 36 小時後所有供試之各臟器均能檢出病毒。但至第 3 日後開始消失，及至第 9 日已無法收回病毒。收回之病毒量最高達 $10^{4.0}$ TCID₅₀/g，從華氏囊被收回之期間為最長。感染鵝也能得到同樣之成績，但病毒在第 7 日以後已無法再檢出。

感染鴨從口腔及泄腔排泄病毒之期間即自第 1 日至第 5 日，第 6 日後為陰性。感染鵝之病毒排泄與鴨相似。

NDV 人工感染鴨及鵝之 HI 及中和抗體之產生自第 1 週開始上昇，並持續至 3 週後開始下降，至第 7 週後已無法檢出抗體。

由第一報獲知在臺灣所飼養之鴨和鵝之間廣泛保有 ND 抗體，並且自 ND 非發生地區之健康鴨也能分離到 NDV。為更進一步探討 NDV 對鴨和鵝之感染情形，進行 NDV 之人工感染試驗，對 NDV 在鴨和鵝體內之增殖及分佈情形，抗體產生及病毒排泄作試驗。

材料及方法

1. 人工感染鴨及鵝體內 NDV 之分佈及消長試驗

1). 病毒接種：鴨及鵝均使用 4 週齡者，而接種 $10^{7.0}$ EID₅₀/隻 NDV 佐藤株於內股肌肉內。病毒接種後 48 小時內每 6 小時，第 3 日起每 24 小時各放血 2 隻採取腦，氣管、肺、脾、肝、胰、腎、大腸，華氏囊及血清等供為病毒分離外做為 HI 及中和抗體測定之用。病毒接種鴨及鵝採取材料同時觀察一般症狀及解剖變狀。

2). 病毒量之測定：製成後凍結保存之鴨及鵝之各臟器乳劑經 10 倍階段稀釋後各稀釋液之 0.1ml 接種於 4 支之 CK 細胞，在 37°C 感作 2 小時後吸出接種乳劑加入維持液後在 37°C 迴轉培養 5—6 天，產生 CPE 之試管判定為病毒陽性。所得之成績以 Behrens-Kärber⁽⁸⁾ 之方法算出臟器中之病毒含量 (TCID₅₀/g)。胰臟乳劑接種後于 37°C 感作 1 小時後以培養液洗淨除去接種乳劑，再加入維持液後和其他臟器乳劑同樣的方法來測定病毒含有量。

2. 人工感染鴨和鵝之 ND 抗體之消長及病毒排泄試驗。

鴨和鵝各使用 35 及 60 日齡，接種 $10^{7.0}$ TCID₅₀/隻 NDV 佐藤株於內股肌肉並飼養在鷄籠內。病

註：本研究報告係筆者於 1980 年提出日本麻布大學之博士學位論文第二報。

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp., 16 : 57—72 (1980)

毒接種後鴨和鵝均為每星期採血，測定 HI 及中和抗體。病毒排泄試驗所使用之材料，由病毒接種鴨及鵝之口腔及其泄腔以滅菌棉棒採材，放入裝 3 ml Earle's 液之小試管內，置室溫 2 小時後以 3,000 rpm 20 分鐘遠沈後採取上清保存在 -75°C 備用。

結 果

1. NDV 在人工感染鴨及鵝體內之分佈消長。

NDV 佐藤株接種於 4 週齡之鴨和鵝腿內股肌肉後自第 6 小時至第 10 日檢討 NDV 在體內分佈，其結果如圖 1 及 2。

1). 在鴨體內之病毒分佈及消長：病毒接種 6 小時後 2 例均可自肺，肝及腎以及 2 例中之 1 例之脾收回到病毒，接種後 24 小時至第 3 日能收回到病毒之臟器為最多，以後能收回到病毒之臟器漸減，

Table 1. Recovery of Virus from Intramuscularly Inoculated Ducks.

iDuck No.	Swabs obtained from	Days after inoculation						
		1	2	3	4	5	6	7
151	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-
152	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	-	+	-	-	-	-	-
153	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
154	Cloacal	+	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	+	-	-
155	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
156	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	-	+	+	-	-	-	-
157	Cloacal	-	+	+	+	+	-	-
	Oral	-	+	+	+	-	-	-
158	Cloacal	-	+	+	-	+	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
159	Cloacal	-	-	+	-	-	-	-
	Oral	-	+	+	-	-	-	-
160	Cloacal	-	+	+	+	+	-	-
	Oral	-	+	+	-	-	-	-

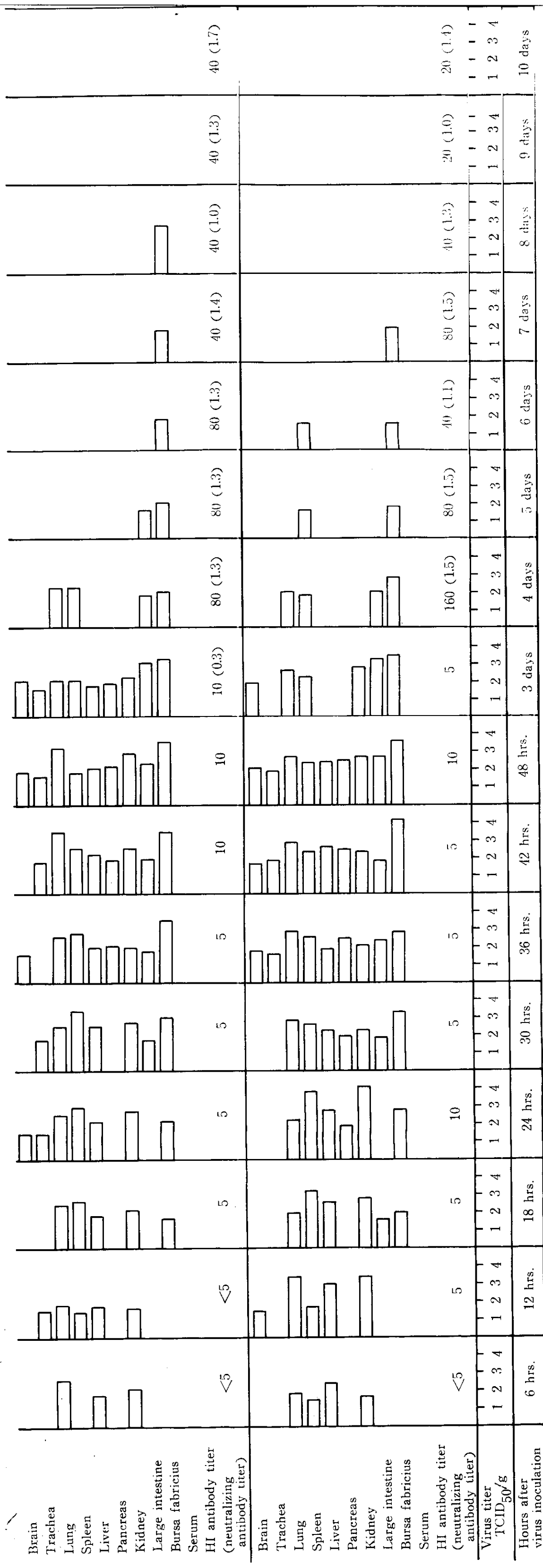
1) : Negative for virus recovery.

2) : Positive for virus recovery.

Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.

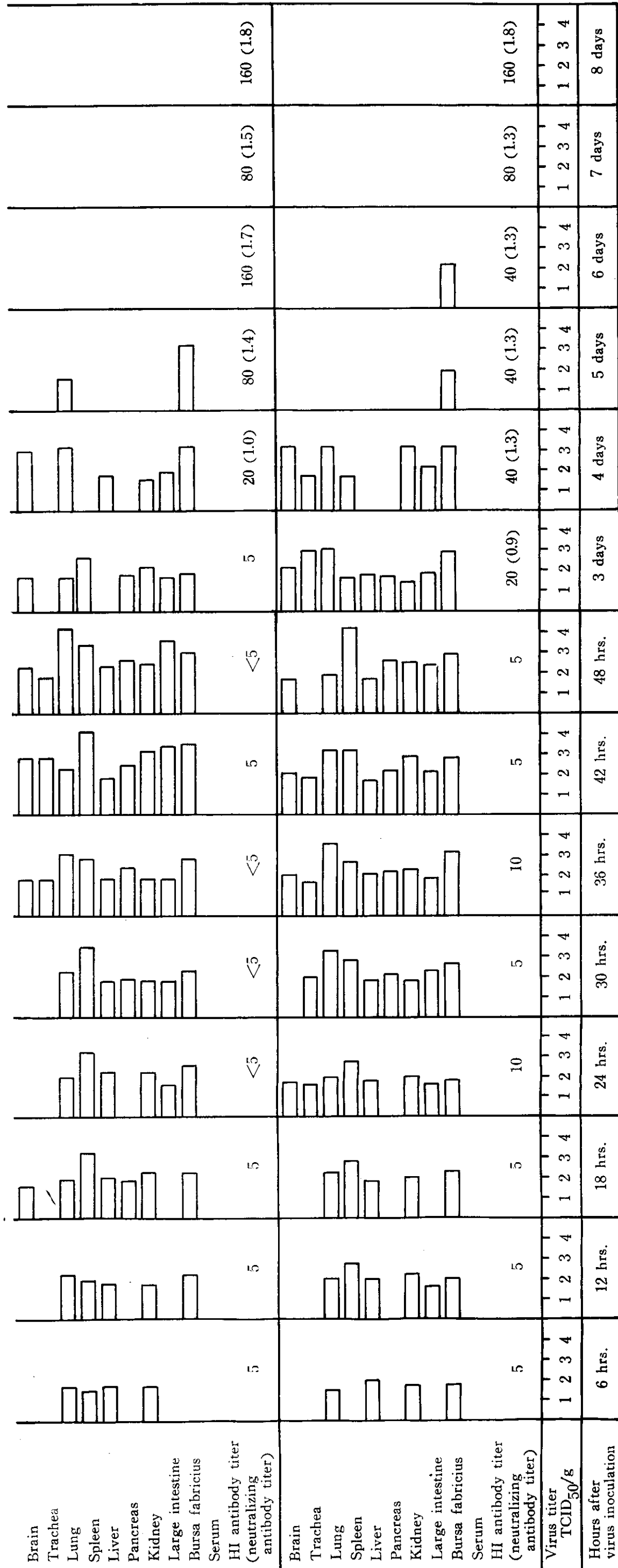
Age at inoculation : 35 days old.

Fig 1. Distribution of ND virus in the Bodies of Infected Duck.



1. Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.
2. Route of inoculation ; intramusculary.
3. Age of duckling at inoculation ; 4 weeks old.

Fig 2. Distribution of ND Virus in the Bodies of Infected Goose.



1. Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.
 2. Route of inoculation : intramuscular.
 3. Age of goose at inoculation : 4 weeks old.

Table 2. Recovery of Virus from Orally Inoculated Ducks.

Duck No.	S wabs obtained from	Days after inoculation						
		1	2	3	4	5	6	7
161	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
162	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-
163	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-
164	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
165	Cloacal	-	-	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-
166	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	-	-	-	-	-
167	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	-	+	-	-	-
169	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
170	Cloacal	-	+	-	-	+	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-

1) : Negative for virus recovery.

2) : Positive for virus recovery.

Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.

Age at inoculation : 35 days old.

至接種後 4—8 日僅能自 2·3 之臟器收回，至第 9 日已無法檢出病毒。從肺，大腸及華氏囊能收回病毒的時間為最長 ($P < 0.05$)，由腦，氣管及胰臟之時間為最短，又自血清中無法分離病毒。一般被收回之病毒量在 $10^{1.5}—10^{4.0}$ /g 之範圍，肺、脾及華氏囊之病毒含量較高。病毒接種後鴨血清中之 HI 抗體即第 42 小時開始上昇至第 4 日到達 80—160 倍，中和抗體自第 3 日開始出現，第 4—10 日之中和價為 1.1—1.7，自抗體上昇之第 4 日起能收回病毒之臟器逐漸減少，且病毒量也不多。

2). 鵝體內之病毒分佈及消長：自病毒接種 6 小時後可自肺、脾、肝、腎及華氏囊收回病毒，接種後 30 小時至第 3 日能收回病毒的臟器為最多，以後漸漸減少。至接種後第 5—6 日能收回病毒的臟器不多，至第 7 日已無病毒。病毒自肺、脾、腎及華氏囊能收回的時間為最長 ($P < 0.05$)。腦及氣管只有短暫時間能收回病毒，又血清中均無法收回病毒。從臟器中收回的病毒量在 $10^{1.5}—10^{4.0}$ /g 之範圍內，肺及脾之病毒含有量較高。病毒接種鵝血清中之 HI 抗體自第 3 日後開始上昇至第 6—7 日達 80—160 倍。中和抗體自第 3 日可檢出，至第 4 日以後達 1.0—1.8。從抗體上昇之第 3 日為始，不但能收回病毒之臟器減少，病毒量也遂時減少之現象。

2. NDV 人工感染鴨及鵝之病毒排泄。

Table 3. Recovery of Virus from Intramuscularly Infected Geese.

Goose No.	Swabs obtained from	Days after inoculation						
		1	2	3	4	5	6	7
41	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
42	Cloacal	+	+	+	-	-	-	-
	Oral	-	+	+	+	-	-	-
43	Cloacal	+	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
44	Cloacal	-	+	+	+	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-
45	Cloacal	-	+	+	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	+	-	-

1) : Negative for virus recovery.

2) : Positive for virus recovery.

Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.

Age at inoculation : 35 days old.

Table 4. Recovery of Virus from Orally Infected Geese.

Goose No.	Swabs obtained from	Days after inoculation						
		1	2	3	4	5	6	7
46	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	-	-	-	-
47	Cloacal	-	-	+	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	+	-	-
48	Cloacal	-	+	-	-	-	-	-
	Oral	+	-	+	+	-	-	-
49	Cloacal	-	-	-	-	+	-	-
	Oral	+	+	+	+	+	-	-
50	Cloacal	-	-	-	-	-	-	-
	Oral	+	+	+	+	-	-	-

1) : Negative for virus recovery.

2) : Positive for virus recovery.

Virus content in the inoculum : $10^{7.0}$ EID₅₀/bird.

Age at inoculation : 35 days old.

Fig. 3. Antibody Against ND Virus in Intramuscularly Inoculated Ducks.

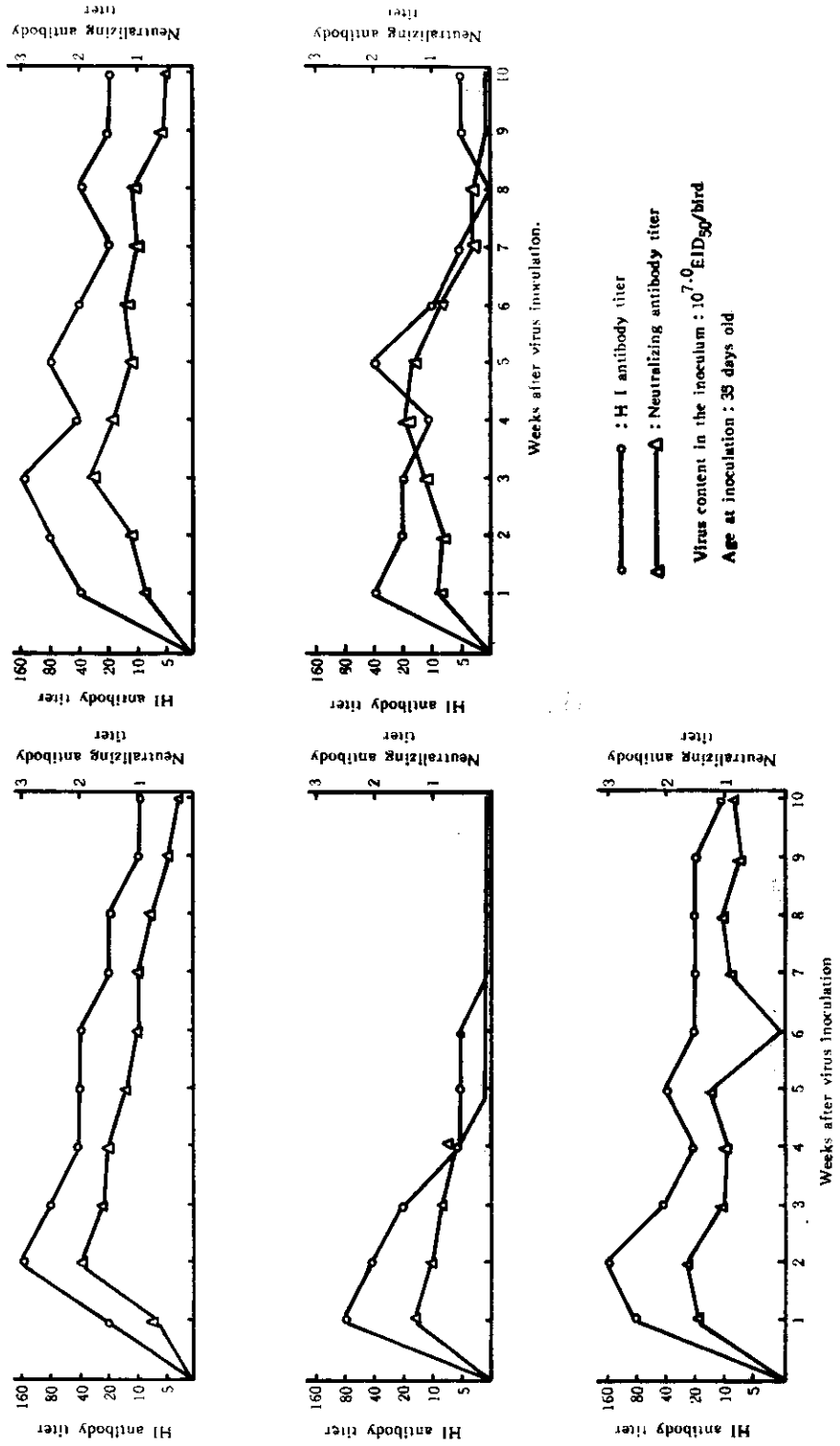


Fig 4: Antibody Against ND Virus in Orally Administered Ducks.

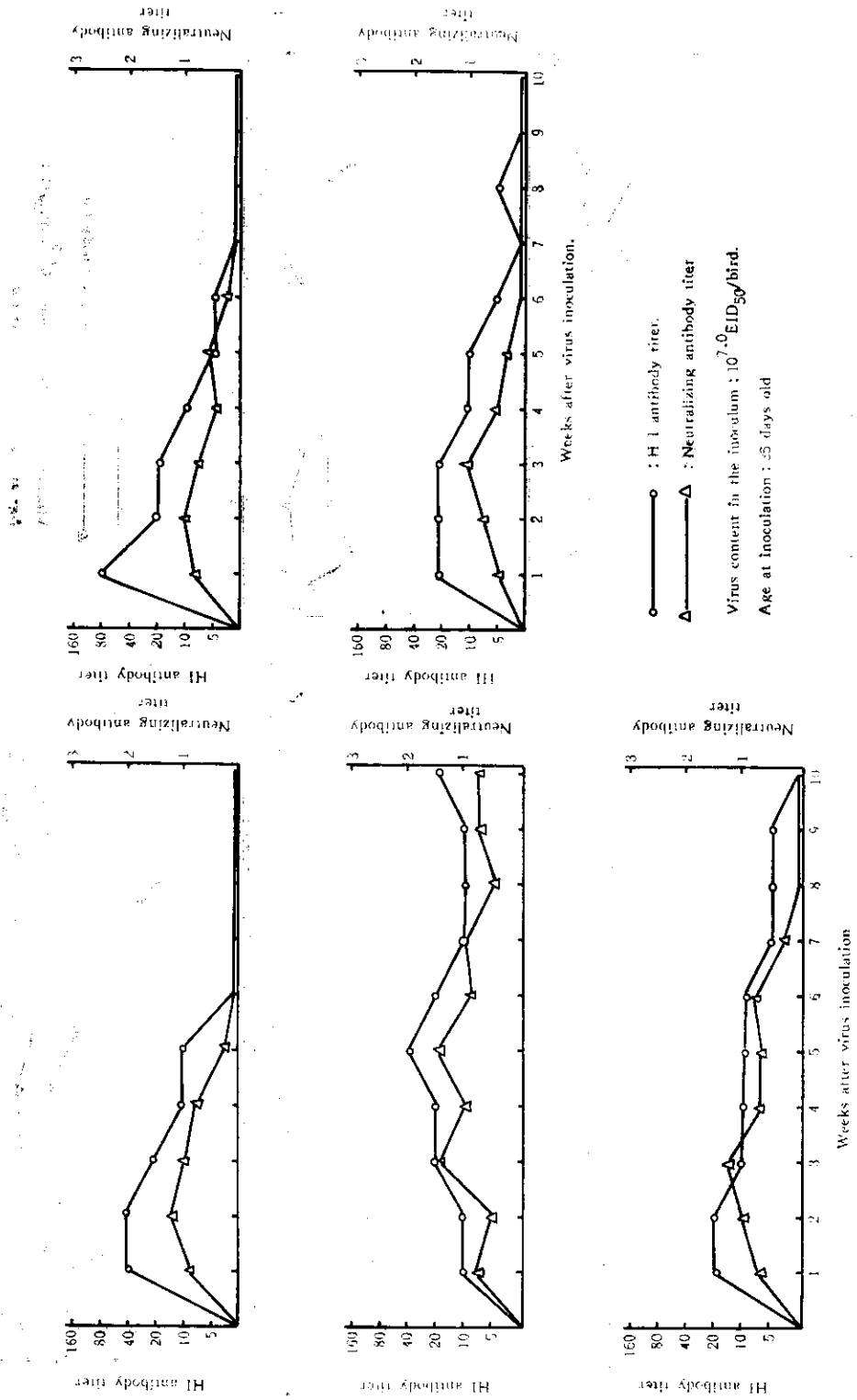


Fig 5. Antibody Against ND Virus in Intramuscularly Inoculated Geese.

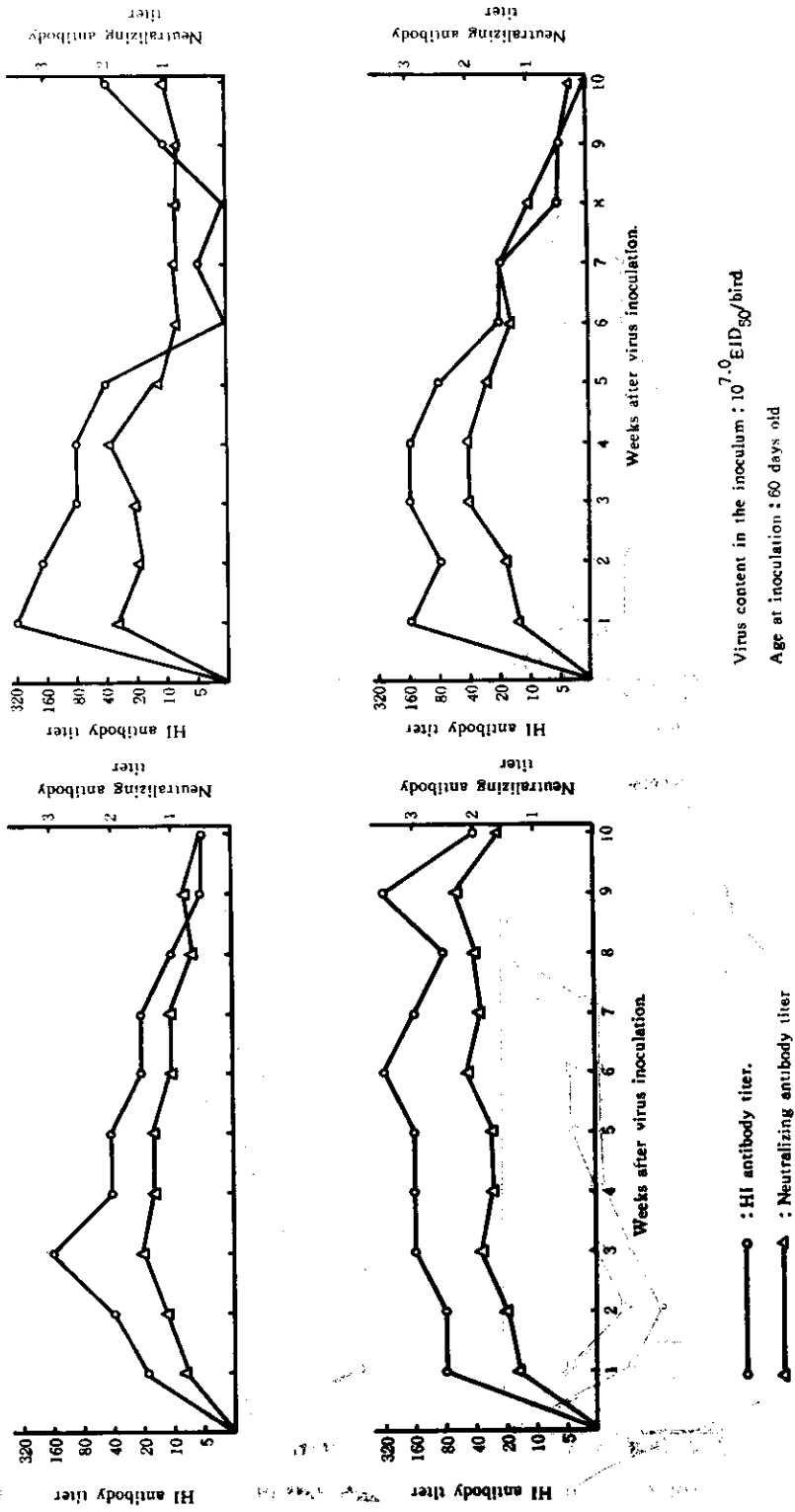
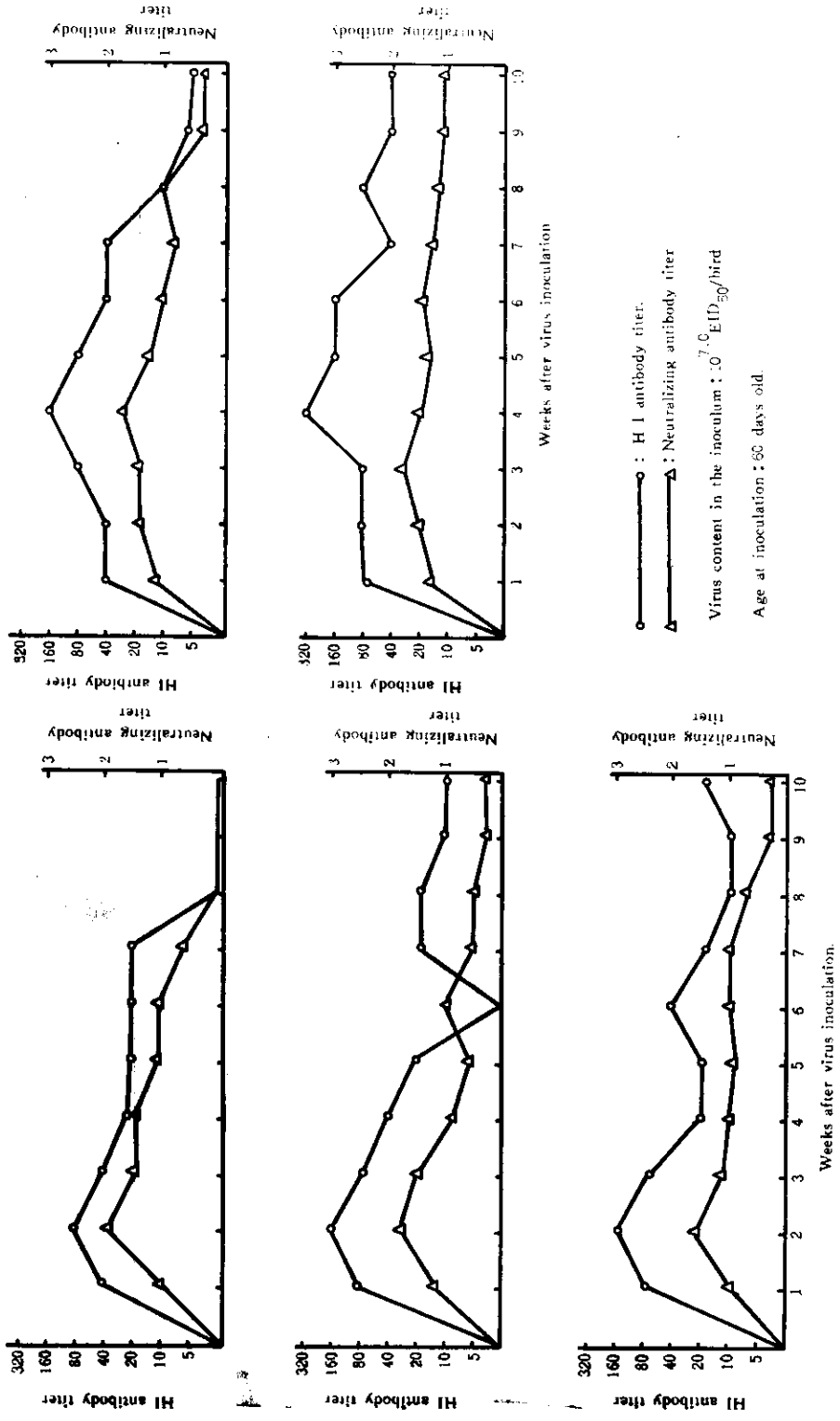


Fig 6. Antibody Against ND Virus in Orally Administered Geese.



1). 人工感染鴨之病毒排泄：NDV 佐藤株接種鴨肌肉及經口投與兩法來檢討，成績如表 1 及 2。肌肉病毒接種後第 1 日從口腔粘液 5 例，共泄腔 1 例能收回病毒。

第 2 日後均能從全例收回，又接種後第一日從口腔及共泄腔均能收回者僅 1 例，其口腔內病毒之出現似比共泄腔為快。接種鴨能收回病毒為 5 天，從第 6 天後已無法收回。口投組從共泄腔自第 2—5 日僅能自各 1 例收回病毒，又從口腔粘液收回病毒即自投與後第 1 日可從全例收回。由此成績顯示從共泄腔病毒之收回較口腔粘液為低。又病毒之排泄與肌肉內注射組相似，同樣能收回至第 5 日，從第 6 日後已無法收回病毒。

2). 人工感染鵝之病毒排泄：係用 60 日齡鵝隻，分為肌肉及口投接種兩組來檢討，其結果如表 3 及 4。肌肉接種組均全例接種後第一日就能收回到病毒，此後於第 4 日除部份外已無排毒，又口腔粘液在第 5 日僅從 1 例檢出病毒。口投組即病毒接種後第 1 日從全例之口腔粘液，共泄腔即於第 2, 3 及 5 日後各僅自 1 例收回到病毒。其病毒收回率比口腔粘液為低，而病毒排泄期間為 5 日至第 6 日後已無法證明。

3. NDV 人工感染鴨與鵝血中抗體之消長

鴨與鵝之 HI 及中和抗體之產生情形及消長如圖 3, 4, 5 及 6。

1). 鴨血中抗體之消長：肌肉內接種組在接種後第 1 週抗體上昇並持續至 3 星期，最高之 HI 價為 160 倍，而中和價到達 2.0。至接種後 4 星期時抗體開始下降，而第 7 星期後 HI 價已跌至 5 倍以下。病毒口投組至接種後第 1 週抗體開始上昇，其 HI 價為 80 倍，中和價為 1.5。至第 6 星期抗體下降，有些早在 2 星期時，而大部份試驗例即在第 6 星期時已無法檢出抗體。

2). 鵝血中抗體之消長：肌肉內接種組在接種第 1 週後抗體上昇，HI 價 320 倍，中和價為 1.8。抗體維持至第 3 週，至第 6 週抗體開始降低。口投組在第 1 週抗體上昇，並持續至 3—4 週，然後抗體開始下降，有些自 3 週即下降，在觀察 10 週期間仍有持續者，也已無抗體存在。

討 論

有關鵝、鴨、鵝或其他動物體內之 NDV 之增殖及分佈之報告比較少見。張⁽¹⁾曾報告以大量 ND 病毒接種鴨後在 2—4 日可收回病毒。對 NDV 在鵝體內各臟器之分佈及消長曾由 Hofstad⁽⁶⁾ 所檢討，以野外強毒接種於 9—12 週齡之鵝皮下及鼻腔內後，在第 24 小時至第 7 日均能自臟器收回病毒，收回病毒量最多者為第 4 日之肺及氣管，其病毒量達 $10^{7.0}$ EID₅₀/ml。病毒接種後在 5—7 日就能檢出中和抗體。Jungherr⁽⁷⁾ 以噴霧方式讓 34 日齡之小鵝感染 NDV，接種後在第 4 日就出現臨床症狀，病毒在第 10, 12, 19 日均從脾及氣囊檢出，又自口腔及共泄腔採材分離病毒除第 11 日之 1 例者外，其餘均為陰性。中和抗體之上昇情形由病毒接種後第 8 日至第 15 日達 $10^{3.0} \leq$ 。Miller and Miller⁽¹²⁾ 使用 10 週齡鵝以肌肉內，氣管內接種病毒以及自然感染方式檢討 NDV 在體內之滯留時間，Gastafson and Moses⁽⁴⁾ 以從 NDV 人工感染麻雀之腦及糞便能收回病毒。Kaymer⁽⁹⁾ 曾報告從感染 NDV 之 Jackdaw 之臟器無法收回病毒，Hofstad⁽⁵⁾ 大量接種 NDV 於小豬，其抗體產生且慢又低，但小豬經病毒接種後在 3—11 日即告死亡而羊如大量接種 NDV，其抗體產生比豬為早，而被接種的羊於 5—32 後死亡。Komarow and Goldsmit⁽¹¹⁾ 以鴨繼代 NDV，張和康亦檢討以鴨繼代 NDV，結果必需 3—5 代後再通過雞胚一次始能繼代成功，且繼代初期 NDV 之增殖及回收率均不佳。

關於 NDV 在鴨體內佈 Freind and Trainer⁽³⁾ 曾使野鴨感染後從多數例之腦收回病毒並自部份野鴨之肝，肺及脾而能收回，張⁽¹⁾ 也用大量 NDV 接種於鴨後從第 2 日自肺，氣管，脾及腸收回病毒，病毒接種後 HI 抗體於 5 日上昇，但病毒在各臟器已無法檢出，並報告觀察期間中未能自腦檢出病毒。

以各研究者所敘述，迄今為止對 NDV 在鴨及鵝體內各臟器之增殖情形尚未盡釋明。筆者以 $10^{7.0}$ EID₅₀ 之 NDV 佐藤株接種於 4 週齡之鴨和鵝內股部肌肉內，檢討病毒在鴨體內之動向，鴨隻經接種病毒後 6 小時已能自肺、脾、肝及腎收回病毒，36 小時後病毒從所有供試之臟器中收回。抗體即病毒接種後 3 日開始出現，此時病毒已有自臟器中逐漸消失，第 8 日只能從華氏囊收回。檢出病毒之時間為最長者係華氏囊。一般能收回之病毒量其範圍在 $10^{1.5}$ — $10^{4.0}$ TCID₅₀/g，血清中病毒在觀察期間中無法檢出，其血清中 HI 抗體在第 4 日已上昇至 80—160 倍，中和價為 1.3—1.5，在血中抗體出現同時病毒也自臟器中消失。

鵝接種病毒後 6 小時開始自肺、脾、腎及華氏囊檢出病毒，36 小時後病毒可自所有供試臟器中檢出。而抗體自第 3 日開始出現之同時，病毒從各臟器中有消失之趨向。病毒接種後第 6 日能檢出之臟器僅存華氏囊，且其保毒之時間為最長。各臟器之病毒含量為 $10^{1.5}$ — $10^{4.0}$ TCID₅₀/g。血清在觀察期間中未能檢出病毒。血中抗體在病毒接種後第 3 日開始上昇，有 1 例之 HI 抗體價達 20 倍，而中和價為 0.9，自第 4 日以後，供試鵝之全例均已出現血中抗體，於其同時病毒也逐漸自臟器中消失。

綜合以上所述筆者認為 NDV 在鴨及鵝體內所增殖之程度大約相同，但鴨及鵝體內所增殖之病毒量較鵝體內之增殖為低⁽⁶⁾。此事已有 Klein and Mollers⁽¹⁰⁾ 以及 Asplin⁽²⁾ 之報告中所述及水禽類對 NDV 之抵抗力較雞及火雞為強。由此點可推測鴨及鵝對 NDV 之感受性為低。

有關 ND 病毒在禽類體內之排泄報告除雞以外，極少有人涉及，據 Asplin⁽²⁾ 之報告曾述及鴨及鵝會傳播本病毒。Friend and Trainer⁽³⁾ 以 NDV 接種野鴨未發現有病毒排泄現象。

同樣 Spalatin and Hanson⁽¹³⁾ 也報告野生鴨不會從雞感染到 NDV，而雞也不會從鴨得到 ND 之傳染。

筆者在探討鴨及鵝 NDV 排泄情形結果，認為鴨之 NDV，以肌肉接種組經病毒接種後第一天已能從一部份鴨之口腔檢出病毒，此後 4—5 日中均能收回病毒，但供試鴨中有 1 例在觀察期間中無法從共泄腔檢出病毒。又病毒口投組在接種 1 日後均能從口腔粘液中檢出病毒，持續 3—4 日。但自共泄腔之病毒收回率即較口腔粘液為低。對鵝之病毒排泄試驗結果與鴨略似，由以上成績顯示雖鴨及鵝所排泄病毒較少，但可證實有病毒排泄之現象，從前有關對鴨病毒之傳播成績未能一至之原因，可能由於所排泄之病毒量較少，以及自感染鴨所分離之病毒大部份為弱毒型，且無法依臨床上診斷是否有感染 NDV 等所致。

對各種禽類感染 NDV 後其抗體消長之研究，有關雞方面之報告者居多，對鴨及鵝尚無具體之探討。雞之 HI 抗體經病毒感染後第 7 日開始上昇。筆者對 NDV 人工感染鴨及鵝之血中抗體之消長成績中顯示個體之差異很大，其成績未能完全趨於一致。如肌肉接種組，在病毒接種後第一週即抗體開始上昇，並持續至 3 週，於第 4 週後已開始下降，其 HI 價為 160 倍，中和價有 2.0。至第 7 週後大部份之 HI 價跌落至 5 倍以下。也有少數例持續至第 10 週尚能保持 20 倍之 HI 價。口投組與肌肉接種組同樣在病毒接種後第一週抗體上昇，但其抗體價較肌肉接種組為低，下降也快，至第 6 週已無法檢出抗體。

鵝之抗體產生情形與鴨相似。其口投組之抗體持續期間比鴨稍長，由以上成績可證實鴨及鵝因經感染 NDV 所產生之 HI 抗體及中和抗體可持續數週之久。又在本試驗研究過程中，所使用鴨及鵝經接種 NDV 強毒佐藤株以及在臺灣分離之強毒株，經感染之後能致死之病例甚少。

由此推論，鴨及鵝比雞對 NDV 之感受性頗有差距。

誌 謝

本研究論文之完成，承蒙農業發展委員會補助研究經費，並蒙日本麻布大學家畜微生物學教室教授田淵清博士之指導與鼓勵。論文之斧正復蒙田淵清教授及日本化學及血清療法研究所研究開發部次

長山田進二博士懇切指導。又本研究計劃進行中多蒙農發會劉永和博士之鼓勵，策劃，又蒙太元製藥公司王振弘總經理及本所同仁李金乾、林正陽、林正男等先生，姚韻琴小姐之鼎力相助得以完成。謹此一併敬致謝忱。

參 考 文 獻

1. 張錫祺 (1971) : 土番鴨感染新城雞瘟病毒之研究。省立屏東農專畜獸會報。No. 40, 3—8.
2. Asplin, F. D. (1947) : Newcastle disease in ducks and geese. *Vet. Res.* 59 : 621—624.
3. Friend, M. and D. O. Trainer. (1972) : Experimental newcastle disease studies in the mallard. *Avian Disease.* 16 : 700—713.
4. Gustafson, D. P. and H. E. Moses. (1953) : The English sparrow as a natural carrier of newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 14 : 581—585.
5. Hosftad, M. S. (1950) : Experimental inoculation of swine and sheep with newcastle disease virus. *Cornell Vet.* 40 : 190—196.
6. Hosfrad, M. S. (1951) : A quantitative study of newcastle disease virus in tissue of infected chickens. *Am. J. Vet. Res.* 12 : 334—339.
7. Jungherr, E. (1948) : Report of the committee on modes of spread of newcastle disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 112 : 124—125.
8. Karber, G. (1931) : Beitrag zur kollektiven Behandlung Pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 162 : 480—483.
9. Keymer, I. F. (1961) : Newcastle disease in the jackdaw (*Corvus modenula*). *Vet. Res.* 73 : 119—122.
10. Klein, F. K. and B. Mollers. (1905) : Ueber Huhnerpest bei Ganser (On fowl pest in geese). *Zbl. F. Bact. Orig.* I 39 : 545—549.
11. Komarov, A. and L. Goldsmit. (1946) : Preliminary observation on the modification of a strain of newcastle disease virus by intracerebral passage through duckling. *Vet. J.* 102 : 212—218.
12. Miller, B. R. and R. E. Miller. (1950) : Distribution of newcastle disease virus in, and elimination from, intratracheally and intramuscularly inoculated bird. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 117 : 229—233.
13. Spalatin, J. and R. P. Hanson. (1974) : Epizootiology of newcastle disease in waterfowl. *Avian Disease.* 19 : 573—582.

Incidence and Mode of the Infection of Newcastle Disease Virus in Ducks and Geese in Taiwan

II. Virus multiplication, distribution, mode of excretion in the infected ducks and geese and its antibody response.

Y. H. Yang

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

The viral multiplication and antibody persistence in experimental infected birds were studied :

1). Multiplication of N D virus in infected ducks and geese : In the case of ducks, the virus was first detected from the lung, liver, kidney and spleen at six hours after the inoculation and from all the organs examined between 24 hours to three days. Virus titer was high in the lung, spleen and bursa. It was similar in the case of geese. Recovery rate and titer of the virus decreased at the third day when antibody began to develop.

2). Isolation of N D virus from the infected ducks and geese : The birds were inoculated intramuscularly or orally with $10^{7.0}$ EID₅₀ of the Sato strain. Virus was detected from oral and cloacal cavity from the first to the fifth day after inoculation.

3). Antibody response of the infected ducks and geese : The antibody persisted for three weeks and reached the maximum level of 1 : 160 H I titer and 2.0 N T titer in ducks, and began to decline on the fourth week. In geese, the antibody was first detected 1 : 320 in H I test and 1.8 in N T test on the first week and began to decline after six weeks of the inoculation.