

豬假性狂犬病不活化疫苗之免疫效力

鍾明華 賴秀穗 林榮培

摘要

豬假性狂犬病臺灣分離毒株 Prv-TNL 以 RK-13 株細胞增殖之，後再以紫外線不活化，並以 DEAE-Dertran 為佐劑製成疫苗，分別接種於 4 及 11 週齡小豬，在補強注射二週後之中和抗體分別為 1:37 及 1:25。以 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 病毒量鼻內接種攻擊之，所有免疫豬隻除體溫略有升高外，無任何症狀而耐過，而未免疫對照豬則全數發病或斃死。又以無抗體懷孕母豬免疫接種兩次再行攻毒，試驗母豬均正常分娩。

緒言

本省豬假性狂犬病首於民國 60 年在屏東地區發生 (9)，一直到目前本病仍繼續蔓延，且有逐漸惡化之勢，對本省產豬事業構成極大之威脅。由於豬隻一旦感染之後部份豬隻形成潛伏持續性感染，不易發覺而淘汰之，且本病毒可經細胞間橋而侵入鄰近正常細胞，不會與細胞外之抗體接觸，因此可以抗體共存 (4)，構成難以撲滅的因素。目前美國、法國及東歐等國家已有不少的不活化及對毒疫苗，但其效果仍有疑問。對毒疫苗之效力雖比不活化者為優，但仍然會造成持續感染，因之在安全顧慮之下，實不可貿然使用，以免徒增困擾。以往多採用 phenol, formalin 等化學藥品來不活化病毒，但此等藥劑對病毒之封套 (envelop) 及蛋白衣 (capsid) 之蛋白質的破壞變性甚大 (1)，而直接影響病毒之免疫元性 (immunogenicity)，而紫外線的作用時間短暫、作用目標為病毒之核酸，對病毒封套、蛋白衣的蛋白質之破壞小 (8)。不活化疫苗之效力雖較差，但在安全因素之前提下，遂有本試驗之擬定，試以本省分離毒株製成不活化疫苗，並檢討其免疫保護效力。

材料及方法

病毒：PrV-TNL 株係由臺南地區豬隻病例中分離所得，培養於 RK-13 株化細胞，分供不活化疫苗製造及試驗豬隻攻擊用。

病毒增殖：增殖方法已述於前試驗 (2)，攻擊用病毒培養液中則另加 2% 牛胎兒血清。

病毒不活化：病毒不活化方法有二：一以 AEI (C₄H₇N₉，東京化成工業出品) 為不活化劑。即以 0.15% 濃度與病毒混合，在 37°C 恆溫槽內作用 72 小時；一將病毒置於平皿內，以紫外線 (Toshiba, GL-15) 照射之，其距離為 15 cm。處理過之病毒接種於細胞及家兔，證明無病毒存活後，再與 DEAE-Dextran 混合製成疫苗，疫苗內 DEAE-Dextran 量為 50 mg/ml。

中和試驗：依鍾氏等方法實施之 (3)。

動物接種：8 隻 11 週齡、無抗體豬分三組：第一組兩頭注射不含 DEAE-Dextran 之紫外線不活化病毒；第二組四頭注射含 DEAE-Dextran 之疫苗，以上兩組豬隻第一次注射量為 2ml，二週後再補強 4ml；第三組二頭為未免疫對照。所有豬隻均於補強注射二週後以 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 病毒量

攻擊之。另以 8 隻 4 週齡、無抗體小豬分四組，每組兩頭：第一組兩次注射量分別為 1ml 及 2ml，間隔二週；第二組注射量為 2ml 及 4ml 間隔二週；第三組注射量亦各為 2ml 及 4ml，但間隔為一週；第四組為未免疫對照。試驗豬隻皆於補強注射一週後以 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 病毒攻擊之。

野外田間試驗：田間試驗於中部本病流行中之某豬場實施之。120 頭母豬不論配種日期、懷孕與否均同時接受兩次免疫注射，其量各為 2 及 4ml，並於注射前及補強注射二週後採取 45 頭母豬血清，測定中和抗體。其中選取五頭注射前無抗體母豬於懷孕後期以 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 病毒攻擊之。

結 果

8 隻 11 週齡豬隻分三組試驗結果：第一組僅注射不活化病毒者均無抗體產生（表 1），攻毒後，一頭發病死亡，另一頭則呈嚴重徵狀但耐過；第二組豬隻幾何平均中和抗體達 1:37，攻毒後均無異狀耐過；對照組兩頭中，一頭發病死亡，另一頭呈嚴重徵狀耐過。徵狀包括打噴嚏、咳嗽、高燒、流膿性鼻汁、呼吸困難、鼻腔泡沫，運動不協調等。

第二組豬隻臨床除體溫均略有上升（40.3°C）外，無異狀。

TABLE 1: Immune Response of Pigs Vaccinated with Inactivated PrV c/out DEAE-Dextran.

No	Vaccine type	SN titer post-vaccination					Result of challenge
		0	1	2	3	4 (wk)	
11	PrV	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	Sick
13	PrV	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	Dead
1	PrV-DEAE-D	< 2	< 2	2	32	32	Survived
46	PrV-DEAE-D	< 2	< 2	< 2	2	32	Survived
69	PrV-DEAE-D	< 2	2	2	32	32	Survived
70	PrV-DEAE-D	< 2	4	4	32	64	Survived
C1		< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	Dead
C2		< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	Sick

8 隻 4 週齡豬隻分四組試驗結果如表 2：所有疫苗注射豬隻兩次注射一週後之幾何平均中和抗體價為 1:25，攻毒後均無任何徵狀而耐過，但體溫在攻毒五天後上升至 41.3 °C 左右，對照豬隻則悉數發病死亡。

疫苗應用於田間時，所有免疫母豬之抗體均顯著上升（圖 1），五頭母豬攻毒後，其中一頭發生原因不明的流產，其餘四頭均正常分娩，仔豬健存（表 3）。

TABLE 2 : Immune Response of Pigs Vaccinated with Inactivated PrV Vaccine.

No	Dosage (ml)		Interval (wk)	SN titer post-vac.				Result of challenge
	1st	2 nd		0	1	2	3	
1	1	2	2	< 2	4	4	8	Survived
2	1	2	2	< 2	2	9	16	Survived
3	2	4	2	< 2	2	16	64	Survived
4	2	4	2	< 2	2	16	16	Survived
5	2	4	1	< 2	4	16	32	Survived
6	2	4	1	< 2	2	8	32	Survived
C1				< 2	ND	ND	< 2	Dead
C2				< 2	ND	ND	< 2	Dead

ND : Not done

TABLE 3 : Protective Efficacy of The Inactivated Vaccine on Sows.

Sow No	Date Vaccinated	Date Breeded	SN titer		Piglets Farrowed in litter
			Pre-vacci.	Pre-chall.	
312	4.12,26.79	5.1.79	< 2	8	9 Alive
3063	4.12,26.79	5.5.79	< 2	16	13 Dead ^b
5017	4.12,26.79	5.3.79	< 2	16	8 Alive
637	4.12,26.79	5.2.79	< 2	16	10 Alive
310	4.12,26.79	5.1.79	< 2	16	11 Alive & 1 Dead

a : The sows were challenged with $10^{7.0}$ TCID virus intranasally on 7.23.79.

b : The fetuses were aborted by unknown reason on 8.21.79.

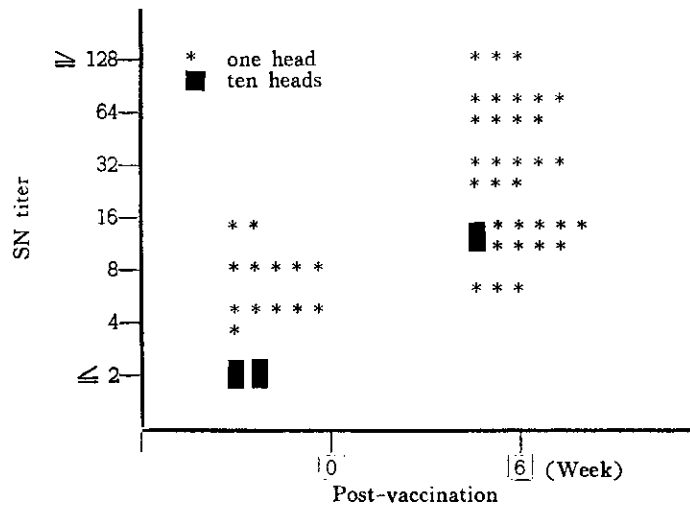


Fig 1 : Immune response of sows in the field test.

討 論

豬假性狂犬病毒不活化方法甚多，目前多採用 AEI⁽⁵⁾、BEI⁽¹¹⁾ 或 EEI⁽⁶⁾ 等化學藥品去處理，在短時間內即可生產大量疫苗，但在本試驗中却發現 AEI 對 PrV-TNL 株不活化效力並不可靠，故改用紫外線照射方式予以不活化。Kaplan⁽⁷⁾ 於 1962 年及 Pfefferkorn 等於 1965 年⁽⁵⁾ 即利用紫外線將豬假性狂犬病毒予以不活化。紫外線能使病毒核酸斷裂，使無法再行 Transcript 及 Translate 等作用。Sun 等⁽¹¹⁾ 亦利用 ⁶⁰CO 放射線不活化假性狂犬病毒。放射線之優點在於其對蛋白抗原物質之破壞小，但可能引起病毒之突變及病毒核酸之重組復活 (recombination)⁽¹⁰⁾，而不可不防。以紫外線不活化病毒，若單獨使用時，完全不能刺激抗體之產生，又由攻毒結果亦可推測其也無法刺激細胞免疫之產生。若與 DEAE-Dextran 混合後，豬隻產生之中和抗體甚佳，但抗體之高低似乎與注射量有關，而兩次注射之間隔似乎無多大影響。因此若能克服產量問題及證明按目前所使用的紫外線照射方式並不引起突變或核酸重組復活等現象，則此疫苗應可成品供用。

本疫苗使用於 4 及 11 週齡小豬，再予攻毒時，體溫均稍有上升，尤以 4 週齡豬為甚，此乃由於攻擊之病毒量過高之故，在自然環境下絕無一次感染 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 病毒量之可能。換言之，若在自然狀況下，本疫苗更能產生更理想之效力。又在田間應用時，由母猪抗體上升之曲線可知此疫苗之抗原性甚優異，懷孕母猪攻毒後一頭母猪發生原因不明之流產，其餘四頭均正常產出健壯仔豬，由此可推斷本疫苗可有效地保護胎兒，亦可知一頭母猪之流產必導因於假性狂犬病以外之因素所致。

誌 謝

本試驗家農發會撥款支助，尤蒙本所陳所長守仕及農發會林再春博士之指導與鼓勵，始得以完成。謹表謝忱，並向本股黃士則及周財發先生之鼎力協助致謝。

參考文獻

1. 王吉德：免疫機構對病毒感染傳播的阻止作用，動物醫學，5：40—41，1979。
2. 鍾明華、賴秀穗：微量免疫擴散與中和試驗對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—70，1979
3. 鍾明華、邱朝齊、林榮培，P. Hummel，陳永雄：臺灣牛隻病毒性呼吸道疾病研究。省畜衛試研報 14：65—72，1977
4. Bachrach, H. L. : Reactivity of Virus in vitro. Prog. Med. Virol. 8: 214, 1966
5. Gutekunst, D. E. : Immune responses in swine given lipid-conjugated pseudorabies viral antigen. Am JVR. 39: 1435-1437, 1978.
6. Jakubik, J., Wittmann, G. and Skoda, R. : Immuisierung von kalbern mit der EEI/DEAE-Dextran-vakzine gegen die Aujeszky'sche krankhei Zbl. Vet. Med. B. 22: 827-832, 1975.
7. Kaplan, A. S. : Analysis of the intracellular development of a DNA-containing mammalian virus (pseudorabies) by means of ultraviolet light irradiation. Virology, 16: 305-313, 1962
8. Kleczkowi, A. : Methods of inactivation by ultraviolet radiation. In "Methods in Virology", Academic press, New York, Vol. IV, P. 93, 1968.
9. Lin, S. L., Tung, M. C., Lin, C. I., Chang, C. F., Huang, W. C. and Cheng, C. M.

- : An outbreak of pseudorabies in swine in pingtung. Chinese J. Microbiol. 5 : 56-58, 1972.
10. Pfefferkorn, E. R., Rutstein, C. & Bruce, B. W. : Photoreactivation of pseudorabies virus. Virology. 27 : 457-459, 1965.
 11. Sun, I. L., Gustson, D. P. and Scherba, G. : Comparison of pseudorabies virus inactivation by Bromo-Ethylene-Imine, ⁶⁰CO irradiation, and Acridine dye in immune assay system. J. Clin. Microbiol. 8 : 604-611 . 1978.

Efficacy Studies of The Inactivated Pseudorabies Virus Vaccine in Swine

M. H. Jong, S. S. Lai, Y. P. Lin

Summary

PrV-TNL virus, an isolate from the island, was propagated in RK-13 cell line and inactivated by ultraviolet. Vaccine was then prepared in using DEAE-Dextran as adjuvant. 4 and 11 weeks old pigs were used to evaluate the potency of the vaccine, the geometric mean neutralization antibody titer of 4 and 11 weeks old pigs two weeks after anamnestic shot were 1:37 and 1:25 respectively. All of them did not show any clinical signs and survived only with mild febrile reaction when challenged with 10^{7.0} TCID virus intranasally. On the other hand, all nonvaccinated control pigs were sick and half of them died after challenge. Pregnant sows in the field trial followed normal and healthy piglets following challenge.