

猪假性狂犬病之研究

I 猪假性狂犬病螢光標示抗體之研製與應用

蘇杰夫 林再春 謝竹茂

(臺灣省家畜衛生試驗所)

假性狂犬病 (Pseudorabies disease) 係於1902年發生在匈牙利，首由Aujeszky¹⁾報告，故又得名為 Aujeszky's disease。1910年 Schmiehdoffer¹⁵⁾首次發表其係由一種 Herpes group virus 所引起之急性傳染病。猪隻之感染首由Shope¹⁶⁾於1934年提出。本病發生於歐洲、英國、美國、南美洲及其他地區，最近 (1971)^{9, 9)} 7月間首次於屏東地區某一企業化經營之大規模養豬場發生，疫勢至熾，僅僅於三個月時間內其為害猪隻頭數幾達三千頭，因本病係首次在臺灣發現，致在診斷上難免遭遇困難，必須藉實驗動物及培養細胞之接種試驗，以檢出病原，需費至鉅且費時間，同時尚有許多不便之處，又田間發生可疑病例之診斷亦因而無法獲得時效。

自 Coons⁴⁾(1950) 研究螢光抗體法成功後，已能將抗原與抗體之反應在普通顯微鏡下直接觀察檢出其病原。各學者已相續應用於疾病之研究及診斷。本省在畜牧獸醫學上已應用於猪瘟^{10, 11, 13)}及猪弓虫病⁸⁾之診斷。

各國研究者咸認螢光抗體法之特異性甚高，且能於短時間內得到正確之診斷結果，為診斷本病最理想之方法，故筆者等擬此研究，今已獲初步成功，茲將本研究之各項試驗成績報告於後：

材料與方法

1. 毒株：

1. 假性狂犬病毒：筆者等由疫區病猪腦材分離之 Pingtung 株及由省立屏東農專分讓之美國標準毒 Aujeszky 株，係以 PK-15 猪腎株化細胞繼代培養，收集培養液分裝小試管，置於 -20°C 凍結保存備用。

2. 猪瘟病毒：ALD 株，係於1949年由 Dr. H. Spears 携贈本所，以前供為結晶紫猪瘟疫苗製造用，目前供兔化猪瘟疫苗之效力檢定攻擊及猪瘟研究等用之猪瘟強毒。以SPF猪隻繼代之毒血清，分裝小試管，置於 -70°C 凍結保存，於本研究供為交叉中和及螢光抗體交叉染色等試驗用。

3. 新城雞瘟毒：宮寺株，係以雞胚胎繼代者，本研究所用者即將該毒接種10日齡之雞胚胎尿囊腔內使其感染，於接種後 36—48小時斃死者經檢出抽其尿液，分裝小試管 -70°C 保存，於本研究供猪瘟中和試驗之攻擊毒用。

二、化學藥品及材料動物和培養細胞：

1. 化學藥品：硫酸銨、Sephadex、DEAE、Fluorescein isothiocyanate等及猪瘟螢光標示抗體（筆者等試製成品）。

2. 材料動物：本所無特定性病原動物中心自產之 3月齡 SPF 小猪。

3. 培養細胞：PK-15 細胞，係於1966年由 Cutter Laboratories 之 E. Stice 從成猪之腎臟獲得之細胞株 (PK-2a) 所分離之 clone 供為 FACCT 法之用；ST 細胞，係3—4週齡 SPF 仔公猪睪丸摘取後，經 Typsin 消化，以細胞培養液配成0.7%細胞懸浮液，供猪瘟中和試驗用。

三、高度免疫血清之製作^{10, 12, 19)}：

將上述兩株假性狂犬病毒株，分別以 10^8 TCID₅₀/ml, 2ml，皮下接種 3 月齡 SPF 小豬，2 週後再以 10^6 TCID₅₀/ml 皮下接種 10ml，此後每隔 2 週再以 100ml-300ml 刺激注射三次，同時採取血液，測定中和抗體價產生情形，最後一次為 300ml，於注射後第 10 天放血，分離血清，經分裝凍結保存供試。

四、交叉中和試驗：

1. 假性狂犬病中和試驗⁹⁾：將假性狂犬病及豬瘟免疫血清，以 2 倍稀釋法稀釋之，再以 10^8 TCID₅₀/ml 之假性狂犬病毒等量混合，於 37°C 感作 1 小時之後，以 0.1ml 接種於 PK-15 細胞，經 4 天鏡檢觀察判定。

2. 豬瘟中和試驗：將假性狂犬病及豬瘟免疫血清稀釋後，再以 10^8 TCID₅₀/ml 之豬瘟毒等量混合，於 37°C 感作 1 小時之後，依 Kumagai⁷⁾等之原法實施，即以感作後之病毒液 0.1ml 與豬單丸 (ST) 細胞懸浮液 0.5ml 混合，經 37°C，4 天靜置培養後，除去培養液再以 1 HA 單位 (約 10^6 PFU/ml) 之宮寺株液 0.1ml 接種，37°C 繼續培養 3 天後鏡檢有無 CPE。

五、螢光標示抗體之調製^{1,10)}：

1. r-globulin 沉澱與透析：將假性狂犬病高度免疫血清 20ml 注入三角燒瓶內，加入等量之 PBS，置於磁性攪拌器上攪拌，外部以冰塊冷卻，緩緩滴入 40ml 之硫酸銨飽和液，繼續攪拌一小時後，置於冰箱一夜，翌日以低溫高速遠心機 8000 rpm 10-20 分鐘遠心，棄除上清液，再以冰冷蒸餾水溶解後，加入等量硫酸銨飽和液，再遠心棄上清液，依同法反覆操作 3 次，最後所得之沉澱加適量之蒸餾水並以 0.01M PH 7.2 之 PBS 於冰箱中，屢換外液透析直至硫酸銨全部除去為止。

2. 蛋白含量之測定：將除去硫酸銨的蛋白液依 Folin 法計算其蛋白含量，並以 0.01M PH 7.2 之 PBS 配成 1% 之濃度，同時測定中和抗體價之變化。

3. 螢光色素之標附：將蛋白質總量之 Fluorescein isothiocyanate 溶解於蛋白溶液 1/3 量之 0.5M PH 9.0 之 Carbonate-Bicarbonate 緩衝液中，然後將此溶液徐徐滴入蛋白液中，外表維持 4°C，於磁性攪拌器上攪拌一夜，使 FITC 與 r-globulin 結合，如此即得粗製之螢光標示抗體。

4. 精製螢光標示抗體液：將標附後之螢光標示抗體液繼續通過 Sephadex (G-25 Coarse) 除去未結合之色素，同時測定其中和抗體價，於 0.005M PH 7.0 之 PBS 透析 1-2 天後，再經過 DEAE column 除去非特异性螢光物質及 F/P 之比率較大的螢光抗體即得精製之螢光標示抗體，並測定其中和抗體價。

六、螢光抗體組織培養法^{1,10)}：

1. 試製螢光標示抗體染色力價測定：將假性狂犬病毒以 10^8 TCID₅₀/ml 0.2ml 接種 PK-15 細胞，37°C 培養，分別於 6、8、10、24 小時等不同培養時間內取出，再把試製螢光標示抗體以 PBS 稀釋成 2、4、8、16 等不同倍數予以染色。

2. 交叉螢光染色：假性狂犬病毒與豬瘟病毒分別於 PK-15 培養 24 小時後，再以試製假性狂犬病及豬瘟螢光標示抗體交叉染色。

試 驗 成 績

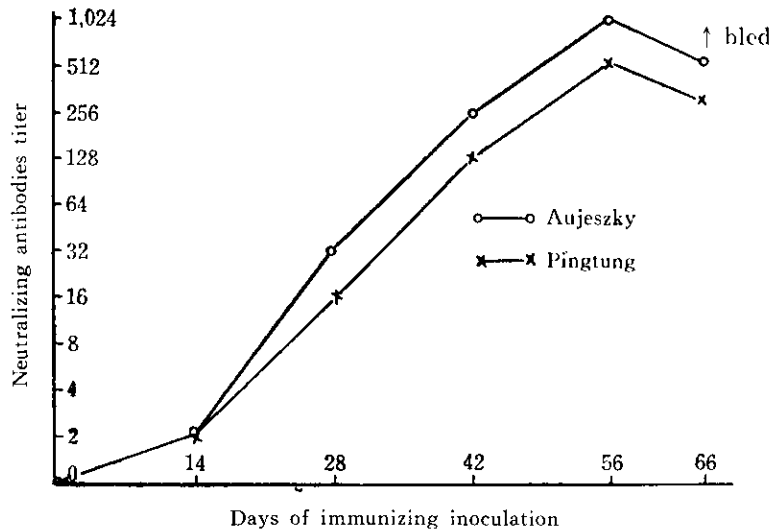
1. 高度免疫血清中和抗體價：

將 Aujeszky 與 Pingtung 兩株假性狂犬病病毒，分別免疫 3 月齡 SPF 小豬，每隔 2 週刺激注射共四次，於注射前同時採血約 10ml 分離血清，以測定中和抗體價產生情形，於最後一次注射前之抗體價却較放血後為高，如圖 1 及表 1 所示。

Table 1. Process of immunization for pseudorabies hyperimmune serum

Pig No.	Virus strain	Dose NT titer	Days of immunizing inoculation					bled
			0	14	28	42	56	
101	Aujeszky		2ml. sc. 0	10ml. sc. 1:2	100ml. ip. 1:32	100ml. ip. 1:256	300ml. ip. 1:1024	bled 1:512
102	Pingtung		2ml. sc. 0	10ml. sc. 1:2	100ml. ip. 1:16	100ml. ip. 1:128	300ml. ip. 1:512	bled 1:256

Fig. 1. Neutralizing antibodies curve of pseudorabies virus immunizing SPF piglets



2. 試製螢光標示抗體製造過程中中和抗體價之變化：

螢光標示抗體製造過程中，經硫酸銨之鹽析分割 γ globulin 之後，以螢光色素 (FITC) 標附，並通過 Sephadex Column 這數段程序之中和抗體價稍為降低，但經 DEAE • Cellulose 通過後則降低 $1/8 \sim 1/16$ 左右，詳如表 2 所示。

Table 2. Neutralizing antibodies titer at different step of fluorescent antibody preparation

Conjugate	Anti-Pingtung	Anti-Aujeszky
Serum	256	512
γ -globulin	128	256
Sephadex	64	128
Final product	16	32
Stain titer	2	4

3. 試製螢光標示抗體之染色力價：

試製螢光標示抗體於通過 DEAE cellulose 時分三個 Fraction 收集，每 Fraction 為 15ml，同時測定其染色力價及非特異性，抗 Aujeszky 株之染色力價較抗 Pingtung 株為高，其結果表 3 所示。

Table 3. Results of Manufacturing Fluorescent Antibody and Stain Titer

Conjugate	Fraction	Collected Fab (ml)	Non-specific	Stain titer
Pingtung	1	15	—	× 2
	2	15	—	× 2
	3	15	—	× 1
Aujeszky	1	15	—	× 4
	2	15	—	× 4
	3	15	—	× 2

4. 交叉中和試驗：

將假性狂犬病及豬癩免疫血清經稀釋後，再分別與假性狂犬病及豬癩病毒交叉中和，究明是否會互相中和，結果抗 Pingtung 株與抗 Aujeszky 株可互相中和，而與豬癩則彼此不相中和，詳如表 4 所示。

Table 4. Cross Neutralization of strain Pingtung & Aujeszky of pseudorabies virus and strain ALD of hog cholera virus

Strain of virus	Anti-serum		
	Anti-Pingtung	Anti-Aujeszky	Anti-ALD
Pingtung	×256	×512	0
Aujeszky	×256	×512	0
ALD (HCV)*	0	0	×4096

*Determined with END method.

5. 螢光抗體一組織培養法：

假性狂犬病毒培養於 PK-15 細胞 6 ~ 8 小時之後，即可檢出抗原散佈在細胞質或細胞核甚至於整個細胞上，如照片 1 ~ 3；16 小時後形成 Plaque 甚為清晰，如照片 4 ~ 6；於 24 小時以後 Plaque 擴大，同時常因 CPE 所致，於 Plaque 中央時有細胞之剝離而形一個窟窿，如照片 7。

6. 假性狂犬病與豬癩交叉螢光染色：

將假性狂犬病毒與豬癩病毒於 PK-15 細胞培養 24 小時之後，再以假性狂犬病及豬癩螢光標示抗體交叉染色，究明是否會互相結合，結果 Pingtung 株與 Aujeszky 株可互相結合，而不能與豬癩螢光標示抗體結合；同樣地，豬癩 ALD 株也不能與假性狂犬病螢光標示抗體結合，詳如表 5 所示。

Table 5. Cross Fluorescence of strain Pingtung & Aujeszky of Pseudorabies virus and strain ALD of Hog Cholera virus

Conjugate	Strain of virus	Intensity of fluorescence
Anti-P	Pingtung	++
	Aujeszky	++
	ALD (HCV)	--
Anti-A	Pingtung	++
	Aujeszky	++
	ALD (HCV)	--
Anti-ALD	Pingtung	--
	Aujeszky	--
	ALD (HCV)	+

++ : Hight bright fluorescence.

+ : Medium bright fluorescence.

-- : Negative.

討 論

Coons⁹⁾等於1942年述及螢光抗體法，1950⁴⁾年開始應用於疾病診斷研究，1961年在美國免疫學會演講報告該法不但特异性及敏感性甚高，而且操作簡便，故現在不但在免疫學且在組織學、細菌學及病毒學等方面被廣泛研究及應用。在畜牧獸病毒學上1961年 Lui¹³⁾首次應用於 Influenza；1962年 Solorzano¹⁸⁾首次應用於 Hog cholera；1963年 Albrecht¹⁾等首次應用於 Pseudorabies，藉該毒培養於雞胚胎 (CE) 細胞後，依螢光抗體法檢出其抗原；1965年 Mc Clurkin¹⁴⁾首次應用於 Transmissible Gastroenteritis。目前本省現已應用於豬瘟^{10,11,12)}及豬弓蟲病⁸⁾之診斷，以目前之設備及技術人材足於發展螢光抗體法。又假性狂犬病於最近 (1971年7月)^{6,9)}侵襲本省，且正是吾國發展養豬事業之際，遭本病為害至鉅，故應用螢光抗體法診斷本病值得開發。

高度免疫血清中和抗體價，於最後一次注射前之力價却較放血後為高，筆者等認為此也許是接種量過多 (300ml) 力價被中和，又放血過早所致，若放血時間延後可能會提高其抗體價，但須考慮其非特异性之增加。Shope¹⁷⁾ (1935) 曾報告過，豬瘟免疫血清可中和假性狂犬病病毒，據筆者等於本研究中行豬瘟與假性狂犬病交叉中和及交叉螢光染色等試驗，結果互不中和及結合，此或許可解釋為該豬瘟免疫血清材料豬，先前曾感染過假性狂犬病，致豬瘟免疫血清中含有假性狂犬病中和抗體，並非豬瘟免疫血清本身可中和假性狂犬病病毒。

Stewart¹⁹⁾等 (1967) 曾報告螢光最先出現於細胞質內；而 Albrecht (1963) 却說最先出現於細胞核內；經筆者等之試驗得知，螢光有時僅見於細胞質或細胞核內，有時整個細胞皆現螢光，此似可解說為病毒是否先附着於細胞質抑是細胞核，然後以此為據點擴大增殖到整個細胞及鄰近細胞而形成 Plaque。又 Stewart¹⁹⁾等 (1967) 曾提過假性狂犬病病毒於 PK-15 細胞培養16小時發生 CPE 后，整個細胞甚難辨出其構造形態，本試驗也如此，僅能見整個 Plaque 而已。

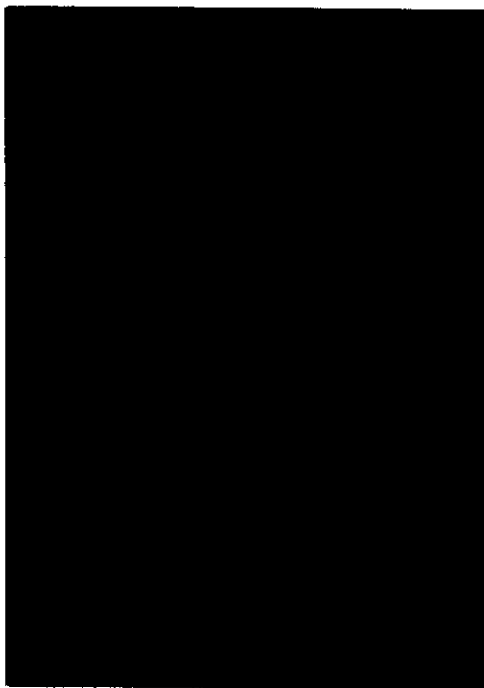
以螢光抗體法行本病之診斷，非但迅速同時其係抗原與抗體之反應，故極為正確。筆者等鑑於此，擬繼續大量研製，以便推廣至各縣市防治所應用，方能及早發現本病，加以控制本病之發生；又本研究係於本省首次研究成功，至於試製成品之保存性及野外毒之應用尚待進一步之探討。

結 論

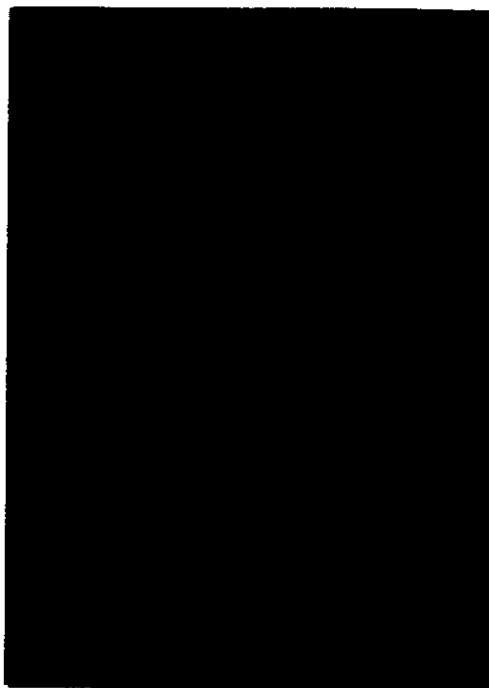
1. 高度免疫血清，測得中和抗體價，抗 Aujeszky 株為512倍，抗 Pingtung 株為256倍。
2. 免疫血清分劃 r-globulin 後，與 1/50 (F/P比率) 濃度之色素 (FITC) 結合標示，再經 Sephadex 及 DEAE column，即得特异性極高、且俱有 2~4 倍染色力價之螢光標示抗體。
3. 螢光抗體—組織培養法：假性狂犬病毒培養於 PK-15 細胞 6~8 小時之后，即可依本法檢出其抗原，同時其 Plaque 甚為清晰，於 24 小時以後其 Plaque 擴大，同時因 CPE 所致，常於 Plaque 中央因細胞之剝離，而形成一個窟窿。
4. 抗 Aujeszky 株及抗 Pingtung 株之假性狂犬病血清與豬瘟血清行交叉中和及螢光染色試驗，結果證明出本所分離之屏東株與美國標準毒 Aujeszky 株係屬同一抗原，而豬瘟與假性狂犬病病毒之抗原性相異。

誌 謝

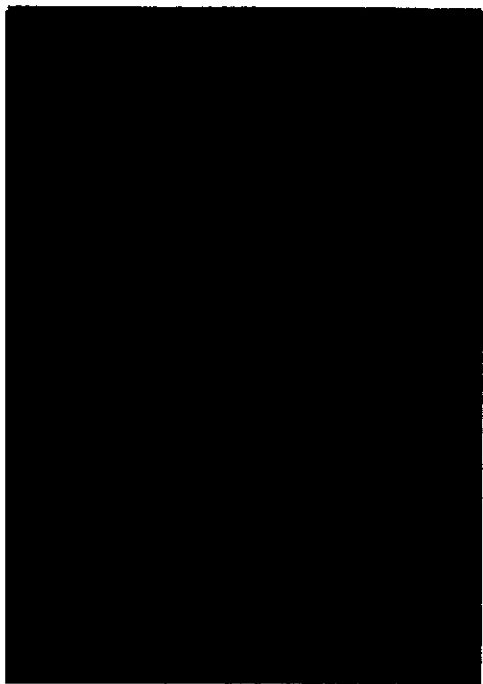
本研究承省立屏東農專供應美國標準株及董明澄副教授兼主任之提供高見，本所陳所長守仕之指導與鼓勵，無特定性病原動物中心供應材料動物，謹此誌謝。



1. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
6-8 hrs postinoculation.
x400



2. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
6-8 hrs postinoculation.
x400



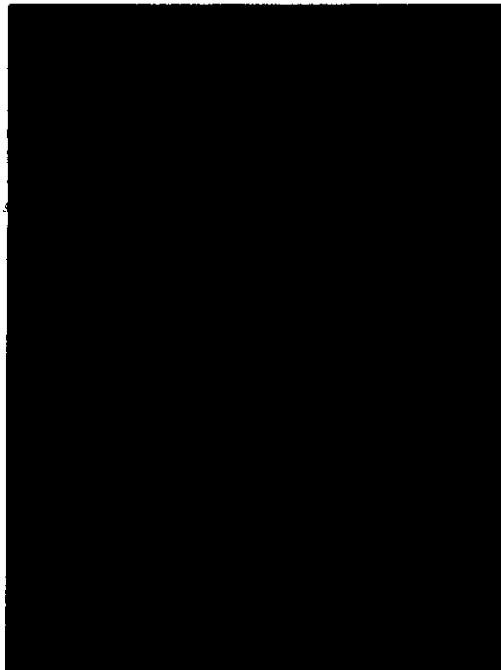
3. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
6-8 hrs postinoculation.
x200



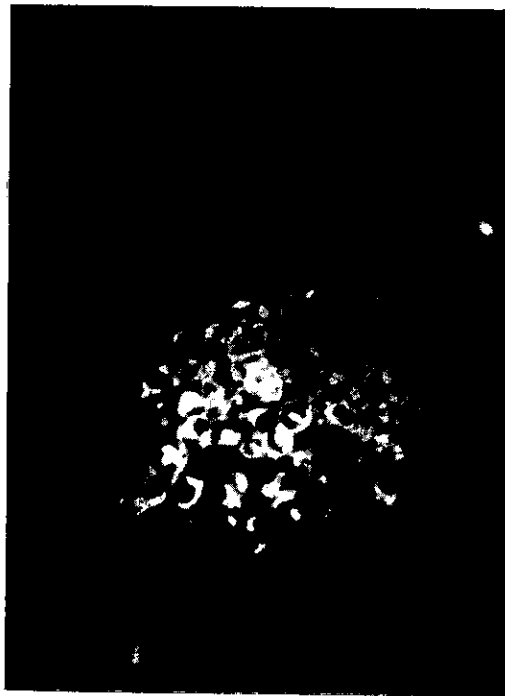
4. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
16 hrs postinoculation.
x200



5. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
16 hrs postinoculation.
x200



6. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
16 hrs postinoculation.
x75



7. Fluorescence in PK-15 cell
infected with prv, stained
24 hrs postinoculation.
x150

參 考 文 獻

1. Albrech, P., Blaskovic, D., Jakubik, J., & Lesso, J. : 1963. Demonstration of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures and infected animals by fluorescent antibody technique. *Act. Virol.* 7, 287-296.
2. Aujeszky, A. : 1902. Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Zbl. Bakt. Abt. I., Orig.* 32, 353.
3. Coons, A. H., Creech, J., Jones, R. H., & Berliner, E.J. : 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45, 159-170.
4. Coons, A. H., & Kaplan, M. H. : 1950 Localization of antigen in tissue cell : II. Improvement in a method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.* 91, 1-13.
5. Howarth, J. A. : 1969 A Serologic Study of Pseudorabies in Swine. *J. A. V. M. A.* Vol. 150, No. 12, 1583-1589.
6. James, P. S. Yang, Philip T. Durfee, Ma, C. H., Chieh, C. P., & Albert, E. New : 1972 An Epizootic of Aujeszky's Disease in Swine in Taiwan : Virus Isolation, Identification & Seroepidemiological Studies. *Chinese Journal of Microbiology*, 5, 69-75.
7. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S., & Matumoto, M. : 1961 A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture : I. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.* 7, 245-256.
8. Lee, C. H., Lin, T. C., Lee, C. : 1970 Studies on the Fluorescent Antibody Technique and Histopathological Changes of swine Toxoplasmosis. *Exp. Rep. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.* 7, 19-34.
9. Lin, S. C., Tung, M. C., Liu, C. I., Chang, C. F., Huang, W. C., Cheng, C. M. : 1972 An Outbreak of Pseudorabies in Swine in Pingtung. *Chinese Journal of Microbiology*, 5, 56-68.
10. Lin, T. C. : 1968 Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for detection and titration of hog cholera virus. *Exp. Rep. of Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health*, 5, 1-22.
11. Lin, T. C. and Lai, S. S. : 1970 Detection and Titration of Lapinized Hog Cholera Virus by means of Tissue Culture Technique. *Exp. Rep. of Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health*, 7, 1-13.
12. Lin, T. C., Lai, S. S., Cheng, Y. C., Shieh, C. M., Chen, Y. C., Lee, C. S., Wu, Y. S. : 1969 Studies of the fluorescent antibody technique for hog cholera diagnosis. *Exp. Rep. of Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health*, 6, 23-32.
13. Lui, C. : 1961 Diagnosis of influenzal infection by means of fluorescent antibody staining. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 83-130.
14. McClurkin, A. W. : 1965 Studies on transmissible gastroenteritis of swine : I. The isolation and identification of cytopathogenic virus of transmissible gastroenteritis in primary

- swine kidney cell culture. *Can. Jour. Comp. Med. Vet. Sci.* 29, 46-53.
15. Schmiedhoffer, J. : 1910 Beitrage zur Pathologie der Infektiosen Bulbarparalyse (Aujeszky'schen Krankheit). *Zeit. Infektionskrankh., Parasitenk. Krankh. Hyg. Haustiere.* 9, 383.
 16. Shop, R. E. : 1934 Pseudorabies as a contagious disease in swine. *Science.* 780-102.
 17. Shop, R. E. : 1935 Prevalence of pseudorabies among middle western swine and the possible role of rats in herd to herd infections. *Jour. Exp. Med.* 62, 101-117.
 18. Solorzano, R. F. : 1962 A fluorescent antibody test for hog cholera. Ph. D. Thesis, Pa. State Univ., University Park.
 19. Stewart, W. C., Carbrey, E. A., Kresse, J. L. : 1967 Detection of Pseudorabies virus by Immunofluorescence. *J. A. V. M. A.* Vol. 151, 6, 747-751.

STUDIES ON PSEUDORABIES DISEASE (AUJESZKY'S DISEASE) IN SWINE :

I. Preparation and application of fluorescent-labeled antibody of pseudorabies

J. F. Su T. C. Lin C. M. Shieh

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

An epizootic of Aujeszky's disease occurred in a large swine herd in southern Taiwan from June through November in 1971. Pseudorabies virus was isolated from the brain of baby pigs suspected of dying of Aujeszky's disease. Immunofluorescence had advantages of speed and accuracy over conventional methods. So that the authors tried to prepare pseudorabies fluorescent antibody conjugate employed in the diagnosis of the disease in this island. The experimental results are summarized as follows :

1. The specific anti-PrV hyperimmune serum could be obtained and used as the source of preparation of pseudorabies fluorescent antibody by employing three month old SPF piglets inoculated with 2 ml of PrV (Pingtung & Aujeszky strain 10^8 TCID₅₀/ml) for basic immunization, and 4 more booster injections of 10^8 ~ 300 ml of PrV(10^6 TCID₅₀/ml) were administered following the basic immunization. The sera thus obtained showed a high neutralizing antibody titer, Anti-Pingtung was 1 : 256, Anti-Aujeszky was 1 : 512, and were considered satisfactory for the preparation of pseudorabies fluorescent antibody.
2. The r-globulin was precipitated by adding the saturated ammonium sulfate solution to the hyperimmune serum, then the protein concentration of the r-globulin solution was determined and conjugated with FITC at the fluorescein-protein ratio of 1/50. The conjugate was passed through Sephadex and DEAE columns to remove the unconjugate-

ted FITC dye and non-specific fluorescein. The conjugate thus obtained through three procedures was very specific for PrV and showed a stain titer of 1:2 to 1:4.

3. Specific fluorescence was observed at 6~8 hours following inoculating PrV on the PK-15 cell line and PrV appeared to form a plaque. At 24 hours the cytopathic effect could be observed, and many infected cells appeared shrunken without discernible nuclei. The entire cell fluoresced at this stage, and had a vacancy in the center of plaque.
4. Anti-Pingtung and Anti-Aujeszky serum showed cross reaction, but never did with HCV. Therefore, the isolate of Pingtung strain had the same antigenicity as Aujeszky strain and differed from HCV.