

豬假性狂犬病 gE 基因缺損不活化疫苗之免疫效力

姜寶仁*、鍾明華、邱資峰、柯浩然、陳 清

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 以本土性豬假性狂犬病 gE 及 TK 雙基因缺損 R23 病毒株及 gE 自然缺損 Bartha 病毒株研製兩種不活化疫苗，對家兔之免疫保護效力均可通過國家檢定標準。兩種不活化疫苗分別在 4 週齡無特定病原小豬免疫兩次，結果顯示豬隻施打 R23 及 Bartha 疫苗後之平均中和抗體力價分別為 1:53.3 及 1:256 倍，再以野外強毒株攻擊後，免疫組中和抗體急劇升高，排毒天數及發熱天數均比對照組少。同時免疫豬隻的血清以 ELISA kit 檢驗結果均顯示 gE 抗體陰性，攻毒後轉為陽性。結果顯示兩者 gE 不活化疫苗對豬隻具有保護力，同時亦具有區分 gE 抗體的功能。

關鍵字：豬假性狂犬病、基因缺損、不活化疫苗

緒 言

豬假性狂犬病(Pseudorabies; PR)主要引起母豬流死產與幼齡仔豬死亡，為台灣重要豬隻傳染病之一。由於豬隻在恢復後，容易形成潛伏性感染，使該病不易撲滅，因而對養豬業造成嚴重的經濟損失。為了減少本病所引起的經濟損失，應將 PR 驅除在豬場之外。目前國內使用的 PR 不活化疫苗，其所刺激產生之抗體與野外病毒感染所產生抗體無法區別，因此也就無法淘汰野外病毒感染之豬隻，進行 PR 清除的工作。

自從 gE-ELISA Kit 問世後，歐美國家陸續利用 gE 基因缺損疫苗配合 gE-ELISA Kit 進行 PR 撲滅工作 [15, 16, 18, 19]，成效良好。隨著 WTO 的入關，如何提昇畜牧業的競爭優勢，除了減少疾病的發生降低成本外，特定疾病的清除亦不失為檢疫防堵的條件，相信可減少對台灣養豬業的衝擊。

為了探討本土性假性狂犬病 gE 及 TK 雙基因

缺損 R23 株病毒 [1, 2] 與 gE 基因自然缺損 Bartha 株病毒不活化疫苗之免疫效力 [10, 12, 13]，研製兩者不活化疫苗進行各項試驗，以期早日供應國內需求。

材料及方法

細胞：

PK-15 細胞是由本所豬瘟研究系分讓，以含有 8% 胎牛血清之 Eagle's MEM 培養液培養之。

病毒：

1. PR-Bartha 株病毒：係由本所豬瘟研究系分讓。
2. PR-R23 株病毒：為中興大學張天傑教授取本所 TNL 株病毒，藉基因重組技術所構築之 gE 及 TK 雙基因缺損病毒 [1, 2]。
3. PR-TNL 病毒：係 1976 年於台灣台南分離之病毒株，目前為本所製劑研究系生產 PR 不活化疫苗之種毒，供家兔保護效力攻毒之用。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

4. PR-TS1 株病毒：由本所豬瘟研究系分讓，係 1991 年由野外病豬扁桃腺分離之病毒株，供豬效力試驗攻毒之用。

病毒增殖、不活化及油質疫苗製作：

依鍾〔4〕等所述方法，當 PK 單層細胞形成後，R23 或 Bartha 病毒以約 0.1 MOI 攻毒，在 37℃ 培養約 1 小時。當細胞變性(cytopathic effect; CPE)完成時收集病毒液，加入 0.02 M binary ethylenimine (BEI)，在 37℃ 作用 10 小時。待不活化完成後將病毒液接種於 PK 細胞及 tryptic soy agar 確認無殘留病毒及無細菌感染後，加入適量佐劑(Emulsigen®)混合而成。

家兔免疫保護效力測定：

依國家檢定標準，選體重 2 公斤健康家兔 12 隻，任選 10 隻分成 2 組，每組 5 隻均間隔 15 日施行 2 次肌肉注射。第 1 組注射 1/3 劑量，第 2 組注射 1/9 劑量，於第 1 次注射後 30 日，連同對照組 2 隻，以強毒株 TNL100 RLD50 肌肉注射攻擊，攻擊後 15 日，以 Reed and Muench 法計算 50% 保護力價(50% protection dosage, PD50)。

R23 株及 Bartha 株不活化疫苗對 4 週齡小豬之安

全試驗：

3~4 週齡，體重 8 公斤左右，無特定病原小豬 2 隻，分別肌肉注射 R23 及 Bartha 不活化疫苗 5 劑量，觀察 4 週。

R23 株及 Bartha 株不活化疫苗對 4 週齡小豬之免

疫效力：

3~4 週齡，體重 8 公斤左右，無特定病原小豬 9 隻，任選 6 頭肌肉注射 R23 不活化疫苗 1 劑量 (2mL) 兩次，間隔三週，另外 3 頭為對照組。第二次免疫後兩週以 PR-TS1 107 TCID50 鼻腔內接種所有小豬，每天測量肛溫，觀察症狀及採口腔棉拭，分離病毒。所有小豬均在第一次免疫前、第二次免疫前、攻毒前及撲殺前採血測中和抗體及 gE 抗體。

另一組試驗中有 SPF 小豬 5 頭，任選三頭為實驗組免疫注射 Bartha 株不活化疫苗，另外 2 頭

為對照組。免疫方法及攻毒模式均如上所述。

血清中和抗體測定及 gE 抗體檢測：

所有小豬免疫前、免疫後及攻毒後之血清均以 Idexx ELISA Kit® 內所附之陽性、陰性對照血清，同時進行檢驗。

結 果

R23 與 Bartha 株病毒在細胞增殖情形：

R23 與 Bartha 株病毒在 PK 細胞均能產生單一圓化之 CPE，且發生 CPE 的時間亦需 48 小時以上，較 TNL 株晚。病毒力價可達 10^8 TCID50/mL，與 TNL 原毒株無異。

R23 與 Bartha 株不活化疫苗家兔保護效力：

如 Table 1 所示，家兔經兩次免疫 R23 及 Bartha 株不活化疫苗後中和抗體有升高，Bartha 組的抗體高於 R23 組。經 100 RLD50 攻毒後，免疫 R23 組 1/3 劑量者死 2 頭，1/9 劑量者死 1 頭。Bartha 組 1/3 劑量者有 1 頭斃死，1/9 劑量者有 4 頭斃死。兩者不活化疫苗的 50% 保護劑量均小於 3^{-1} ，達到國家檢定標準。

R23 與 Bartha 株不活化疫苗對豬安全試驗：

4 週齡 SPF 小豬 2 隻，分別肌肉接種五劑量 R23 與 Bartha 株不活化疫苗，觀察 4 週，注射部位及全身無任何異狀。

R23 與 Bartha 株不活化疫苗豬免疫效力與 gE 抗

體之檢測：

小豬接種 R23 疫苗一劑量 (2mL) 後五週才產生平均中和抗體 53.3 倍，攻毒後急劇上升至 512 倍。小豬接種 Bartha 疫苗一劑量 (2mL) 後三週產生平均中和抗體 23.3 倍，接種後五週上升至 256 倍，攻毒後更急劇上升至 512 倍 (Table 2)。

接種 R23 疫苗小豬在攻毒後有發熱現象，免疫組平均發熱天數為 3 天，排毒天數則為 4 天。接種 Bartha 疫苗小豬在攻毒後亦有發熱現象，免疫組平均發熱天數為 2 天，但沒有排毒。兩組試驗對照豬隻攻毒後均有發熱與排毒，分別為 R23

組的發熱與排毒天數均為 9 天，Bartha 組則為發熱 11 天、排毒 7 天。

免疫前、免疫後 3 週、免疫後 5 週所有試驗豬血清以 Idexx ELISA Kit 檢驗之，結果均顯示 gE 抗體陰性，攻毒後轉為陽性 (Table 2)。

Table 1 、 Responses of rabbits vaccinated with the R23 and Bartha vaccines

Vaccine	Dosage	Mean SN titer			PCW2	No. protected /No. tested
		PVW 0	2	4		
R23	1/3	0	0	24	12	2/4
	1/9	0	0	22	10	4/5
Bartha	1/3	0	4.8	48	ND	4/5
	1/9	0	3.6	40	ND	1/5

PVW: weeks post vaccination

PCW: weeks post challenge

Table 2 Antibody responses of pigs vaccinated with the R23 and Bartha vaccines

Vaccine	NO. pig	PVW0		PVW3		PVW5		PCW2	
		SN titer	gE Ab						
R23	6	0	—	0	—	53.3	—	512	+
Control	3	0	—	0	—	0	—	ND	+
Bartha	3	0	—	23.3	—	256	—	>512	+
Control	2	0	—	0	—	0	—	ND	+

討 論

R23 是去除 TK、gE 與部分 gI、28K 基因 [1, 2] 之減毒病毒，gE 基因的去除可降低病毒的毒力，但不影響病毒的複製，同時可作為區分野外病毒及疫苗病毒的指標 [5, 6]。而 TK 基因的去 除並不影響病毒的複製，也能降低病毒毒力及防止潛伏感染 [9, 17]。本實驗結果顯示 R23 不活化疫苗雖然對家兔具有良好的保護指數，但抗體須等到第二次免疫後才產生，比 Bartha 株不活化疫苗所誘發的抗體晚且力價低。R23 疫苗對小豬的免疫後，則是有發熱反應與排毒。根據鍾 [3] 等報告指出 R23 不活化疫苗對家兔的抗體誘發良好，以及免疫小豬攻毒後皆無排毒，此結果與本實驗結果稍有點差異。但大體上 R23 不活化疫苗對家兔具有良好的保護指數，同時經由 gE ELISA Kit 檢測攻毒前的豬隻證實為 gE 抗體陰性。

報告指出 Bartha 株病毒不僅是 gE 與 gI 缺

損，而且尚有 gC、UL21 及 UL10 的點突變，以上這些雖關係病毒的結構與中和抗體的誘發，但不影響病毒的複製 [7, 9, 10, 11, 12, 13, 14]。本實驗結果顯示 Bartha 不活化疫苗對家兔的 PD₅₀ 良好，同時對小豬的免疫效力極為優異，雖有短暫的發熱，但攻毒後皆無排毒，此結果與鍾等所發表的結果一致。

由本實驗結果得知無論是 R23 與 Bartha 株不活化疫苗皆可符合國家檢定標準，但疫苗的研發不僅單單要考慮效力，同時亦需考慮市場的競爭力與市場的接受度。近年來已陸續有 TK、gE 雙基因缺損活毒疫苗的成功研發與進口，不活化疫苗的市場的確已面臨衝擊。而本土性雙基因缺損 R23 株，雖前後經由鍾等與本實驗證實為 gE 缺損病毒無誤，但其是否為安全有效的活毒疫苗株，仍有待進一步的研究。

參考文獻

1. 許晉銘。假性狂犬病雙基因缺損株-R23 之特性分析。國立中興大學碩士論文。1995。
2. 劉昭君。假性狂犬病毒缺損變異株之誘發及篩選。國立中興大學碩士論文。1992。
3. 鍾明華、李淑慧、丁履紉、吳詩南、詹益波、張天傑、蔡貴雄、李清川。豬假性狂犬病 gE 基因缺損不活化疫苗之免疫效力。省畜衛試研報。31: 29-36, 1995。
4. 鍾明華、李淑慧、邱資峰、楊喜金、詹益波。豬假性狂犬病不活化疫苗油質佐劑在家兔引起之免疫及組織病理反應。省畜衛試研報。30: 11-24, 1994。
5. Brack AR, Klupp BG, Granzow H, Tirabassi R, Enquist LW, Mettenleiter TC. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* 74: 4004-4016, 2000.
6. Brack AR, Dijkstra JM, Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC. Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol* 73: 5364-5372, 1999.
7. Klupp BG, Mettenleiter TC. Mutation affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha. *Virology* 212: 466-473, 1995.
8. Kimman TG, Wind ND. Inactivation of glycoprotein E and thymidine kinase or the US3 encoded protein kinase synergistically decrease in vivo replication of pseudorabies virus and the induction of protective immunity. *Virology* 205: 511-518, 1994.
9. Lomniczi B, Blankenship ML, Ben-porat T. Deletions in the genomes of pseudorabies virus vaccine strains and existence of four isomers of the genomes. *J Virol* 49: 970-979, 1984.
10. Lomniczi B, Watanabe S, Ben-porat T, Kaplan AS. Genome location and identification of function defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus. *J Virol* 61: 796-801, 1987.
11. Mettenleiter TC, Klupp BG, Weiland F, Visser N. Characterization of a quadruple glycoprotein-deleted pseudorabies virus mutant for use as a biological safe live virus vaccine. *J Gen Virol* 75: 1723-1733, 1994.
12. Mettenleiter TC, Zsak L, Kaplan AS, Ben-porat T, Lomniczi B. Role of a structural glycoprotein of pseudorabies in virus virulence. *J Virol* 61: 4030-4032, 1987.
13. Petrovskis EA, Timmins JG, Gierman TM, Post LE. Deletions in vaccine strains of pseudorabies virus and their effect on synthesis of glycoprotein gp63. *J Virol* 60: 1166-1169, 1986.
14. Robbins AK, Ryan JP, Whealy ME, Enquist LW. The gene encoding the gIII envelope protein of pseudorabies virus vaccine strain Bartha contains a mutation affecting protein localization. *J Virol* 63: 250-258, 1989.
15. Ro LH, Lai SS, Hwang WL, Chou HH, Huang JN, Chang EL, Yang HL. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. *Am J Vet Res* 56: 555-561, 1995.
16. Stegeman JA, Tielen MJM, Kimman TG, van Oirschot JT, Hunneman WA, Berndsen FW. Intensive regional vaccination with a gE-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine* 12: 527-531, 1994.
17. Tense RB, Ressel SJ, Fralish FA. The role of pseudorabies virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection. *J Gen Virol* 64: 1369-1373, 1983.
18. van Oirschot JT, De Wall CAH. An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. *Vet Rec* 121: 305-306, 1987.
19. Weigel RM, Lames JR, Herr L, Hahn EC. Field trial to evaluate immunogenicity of a glycoprotein E -deleted pseudorabies virus vaccine after its administration in the presence of maternal antibodies. *Am J Vet Res* 56:

Efficacy Evaluation of the gE-Deleted Pseudorabies Inactivated Vaccines

B. R. JIANG*, M. H. JONG, T. F. CHIU, H. J. KO, C. CHEN

National Institute for Animal Health

SUMMARY The gE and TK double deleted R23 strain of pseudorabies virus (PrV) constructed in Taiwan and a natural gE-deleted Bartha strain were used to develop inactivated vaccines. The protective efficacy of the two vaccines in rabbits could fulfill the requirement of national drug assay. The SPF pigs aged at four weeks old were vaccinated either with the R23 or Bartha vaccine twice at an interval of 3 weeks. Results revealed that the mean neutralizing antibody titers of R23- and Bartha-immunized pigs were 1:53.5 and 1:256, respectively. The neutralizing antibody titers of the vaccinated pigs rose sharply following challenge with the wild type virus. The mean duration of fever and virus excretions in the vaccinated pigs were decreased compared to the control pigs. The specific antibodies against gE in all pigs were maintained negative after two time vaccinations, and seroconverted to positive post challenge with the wild type virus. In summary, these two vaccines provided good protective efficacy in pigs and could be used for differentiating vaccinated from infected pigs.

Keywords: Pseudorabies, Gene-deleted, Inactivated vaccine

*Corresponding Author
National Institute for Animal Health