

不同週齡仔豬對豬瘟疫苗之免疫反應

黃天祥* 杜文珍 鍾明華 劉培柏

台灣省家畜衛生試驗所 豬瘟研究系

摘要 某一無豬瘟病例發生豬場之母豬所分娩的 57 隻小豬，將其分成四組後，於該場實施下列四種不同的豬瘟疫苗免疫計畫。第一組，16 隻，分別於一日齡和三、六週齡時，各由肌肉接種一劑量的兔化豬瘟疫苗。第二組，15 隻，分別於三和六週齡時免疫注射。第三組，13 隻，僅於六週齡時免疫注射一次。第四組，13 隻，則分別於六和九週齡時免疫注射。四組試驗豬隻，分別於免疫注射前、三、六、九和十五週齡以及六月齡上市時各別抽血一次，以 END 法測定豬瘟中和抗體力價。結果，在免疫注射完成後，四組試驗豬隻都可產生主動免疫抗體並可持續至六月齡上市時。唯上市時，第一組至第四組試驗豬隻之豬瘟中和抗體幾何平均力價各有差異，分別為 29 倍、93 倍、256 倍和 265 倍。顯示，小豬之豬瘟預防注射越早實施，上市時其豬瘟中和抗體幾何平均力價越低。

關鍵詞：豬瘟，抗體

緒 言

豬瘟是由豬瘟病毒〔黃病毒科 (Flaviridae) 之瘟疫病毒屬 (Pestivirus)] 所引起豬隻的一種高度傳染性疾病，以全身性出血為主徵，死亡率高達 95~100 %。病程，一般呈急性，但可轉為慢性或不顯性感染，增加防疫及診斷上的困擾^[10, 17]。

豬瘟係本省豬隻重要法定傳染病之一，多年來影響本省養豬事業至鉅。由林博士再春等開發之兔化豬瘟疫苗，雖安全性高且免疫效力優良^[3]，但三十多年來仍無法完全防止豬瘟的散發。此因受到人為因素、疫苗品質和劑量、疫苗存放、免疫計畫不正確和移行抗體干擾、田間帶毒豬隻的存在及對豬瘟未作適時處理等諸多因素的影響，而使疫苗未能充分發揮其免疫效果。有關本省小豬豬瘟疫苗的免疫適期已先後經過三次的調查研究。在 1979 年以前的小豬免疫適期為六週齡^[2]，但在 1979 年後，可能因豬假性狂犬病病毒的普遍感染致使移行抗體普遍降低，仔豬的免疫提早

到三週齡，其免疫效果高達 90 %^[1, 12, 13, 14]。為避免移行抗體干擾疫苗的免疫作用，1980 年後續推出哺乳前的免疫方式，對於豬瘟污染場效果尤佳^[15]。而田間應用上更為多樣化^[5, 6]，但仍無法防止豬瘟的零星發生。為此，本試驗針對目前田間常見之仔豬豬瘟免疫計畫，利用無豬瘟病例的一貫豬場進行測試，探討小豬在不同免疫計畫下豬瘟抗體消長情形，以供仔豬健全豬瘟免疫方式的參考。

材料與方法

病 毒：

- (A) 兔化豬瘟疫苗：係臺灣省家畜衛生試驗所製造並經檢定合格疫苗。製造批號為 2495。供仔豬免疫接種用。
- (B) 豬瘟 A76 病毒株：係由日本分讓，經初代豬羣丸細胞增殖後，1 ml 小量分裝於試管內並置 -70 °C 冰櫃凍結保存。供豬瘟中和抗體

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

測定用。

(C)宮寺株新城雞病病毒：宮寺株係以雞胚胎尿管腔內接種增殖，並經血球凝集反應力價測試後，1 ml 小量分裝於試管內並置 -70°C 冰櫃凍結保存。供豬瘟中和抗體測定時攻擊用。

細胞：

初代豬睪丸細胞，以無菌操作技術取下 4~6 週齡健康小豬睪丸，經去莖膜、剪碎，並以 0.01 M PBS, PH 7.2 和 0.25 % 胰蛋白酶液各洗過一次。組織碎塊，再以 0.25 % 胰蛋白酶液於細胞消化瓶內在磁力攪拌器上，室溫攪拌消化 10~15 分鐘。細胞消化液，先經 150 mesh 濾網過濾後加入 1/10 倍量之 56°C ，30 分鐘非動化處理胎牛血清，置於 4°C 冰箱中。剩餘之組織塊，再重複予以消化，直至全部被消化掉為止。最後，將收集得之細胞濾液經 4°C ，1,000 rpm 離心 5 分鐘。沉澱細胞再以含 10 % 胎牛血清（無 BVD 抗體）、抗生素（Penicillin G Sulfate 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 Streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）和抗黴素（Fungizone 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）之 MEM 細胞培養液泡製成約 4.0×10^6 Cells / ml 的豬睪丸細胞懸浮液。供豬瘟中和抗體測定時用。

1996 年 11 月在桃園縣某一無豬瘟病例的一貫豬場，由其七頭同日分娩母豬所產的 64 隻仔豬，經哺食初乳後即予混合並任意重新分配給這七頭母豬帶養。同時給予作記及分成四組，原擬每組 16 隻，分別實施下列豬瘟免疫注射計畫。但因部份仔豬斃死原故，致使每組試驗豬隻頭數無法保持一致。第一組，仔豬 16 隻，分別於一日齡、三週齡和六週齡時肌肉接種一劑量的免化豬瘟疫苗。第二組，仔豬 15 隻，分別於三週齡和六週齡時肌肉接種一劑量的免化豬瘟疫苗。第三組，仔豬 13 隻，僅於六週齡時肌肉接種一劑量的免化豬瘟疫苗。第四組，仔豬 13 隻，分別於六週齡和九週齡時肌肉接種一劑量的免化豬瘟疫苗。

上述四組試驗豬隻，分別於免疫注射前、三、六、九和十五週齡以及六月齡上市時，即 1997 年 5 月時各別抽血一次，經分離血清和 56°C 30 分鐘處理後，以 END 法測定豬瘟中和抗體力價。

豬瘟中和抗體測定（END method）：血清經 56°C 30 分鐘處理後，於 96 孔微量塑膠細胞

培養盤，每孔加入 50 μl 細胞生長液作為稀釋液並於第一行加入等量血清，每一檢體血清測定兩孔，然後進行 2 倍連續稀釋。稀釋後，每孔加入等量含 100 TCID₅₀ 之 A76 豬瘟病毒液，此時第一行的血清變為 4 倍稀釋。於 37°C 感作一小時後，每孔加入 4×10^5 個初代豬睪丸細胞液 0.1 ml。經 37°C ，5 % CO₂ 細胞培養箱培養 4 天後，吸去培養液，於每孔加入含一單位血球凝集價的宮寺株新城雞病病毒液 0.1 ml 實施攻擊。再放置 37°C ，5 % CO₂ 培養箱培養 3 天後判定其中和抗體力價^[11]。

結 果

第一組，一日齡及三、六週齡免疫組。本組試驗仔豬，雖經三次豬瘟疫苗免疫注射，但豬隻之豬瘟中和抗體力價呈持續性下降至十五週齡，直至六月齡上市時方稍有上升的現象。豬瘟中和抗體幾何平均倍數，一日齡免疫注射時移行抗體高達 386 倍，三週齡時下降為 77 倍。雖經三週時第二次免疫注射，六週齡時抗體仍下降為 38 倍。六週齡時，縱使給予第三次免疫注射，抗體力價仍然繼續下跌，九和十五週齡時分別為 30 倍和 22 倍。唯此一低倍抗體力價可持續至六月齡上市時，且稍有回升現象，為 29 倍（圖 1 和表 1）。

第二組，三、六週齡免疫組。本組試驗仔豬豬瘟中和抗體幾何平均倍數，三週齡免疫注射時移行抗體力價為 61 倍，六週齡時降至最低，為 22 倍。雖六週齡時給予第二次免疫注射，九週齡抗體力價也只有 23 倍，但至十五週齡時抗體顯著上升，為 117 倍。唯六月齡上市時，則降為 93 倍（圖 1 和表 1）。

第三組，六週齡免疫組。本組試驗仔豬豬瘟中和抗體幾何平均倍數，六週齡免疫注射時移行抗體力價為 22 倍，免疫注射三週後即九週齡時抗體非但無上升現象反而下降至最低，為 13 倍。但十五週齡時則呈顯著上升，為 115 倍，且持續上升至六月齡上市時，為 256 倍（圖 1 和表 1）。

第四組，六、九週齡免疫組。本組試驗仔豬豬瘟中和抗體幾何平均倍數，六週齡免疫注射時移行抗體力價為 27 倍，第一次免疫注射三週後即九週齡時抗體非但無上升現象也反而下降至最低，為 20 倍。但經九週齡第二次免疫注射後，於十五週齡時抗體則呈顯著上升，為 176 倍，且持續上升至六月齡上市時，為 265 倍。整體而言，抗體力價之消長情形與第三組類似（圖 1 和表 1）。

表 1 仔豬四種豬瘟免疫方式免疫前、後豬瘟中和抗體幾何平均力價

組 別	一 日 齡	三 週 齡	六 週 齡	九 週 齡	十五週齡	六 月 齡
第一組 一日齡及 三、六週 齡免疫	8.5938 ±	6.2667 ±	5.2667 ±	4.9 ±	4.4333 ±	4.8333 ±
	1.2546	1.3211	0.8633	1.1680	1.6132	1.8290
	(386 X)	(77 X)	(38 X)	(30 X)	(22 X)	(29 X)
第二組 三、六週 齡免疫		5.9333 ±	4.4643 ±	4.5357 ±	6.857 ±	6.5455 ±
		1.1932	0.7712	1.0089	1.8106	1.6501
		(61 X)	(22 X)	(23 X)	(117 X)	(93 X)
第三組 六週齡 免疫			4.4615 ±	3.7308 ±	6.8462 ±	8.0 ±
			1.4500	0.8321	1.0284	0.9574
			(22 X)	(13 X)	(115 X)	(256 X)
第四組 六、九週 齡免疫			4.7308 ±	4.3077 ±	7.4583 ±	8.05 ±
			0.8567	0.7228	1.4687	0.9846
			(27 X)	(20 X)	(176 X)	(265 X)

註：中和抗體價 (Log₂) ± SD；而括弧內為中和抗體幾何平均倍數。

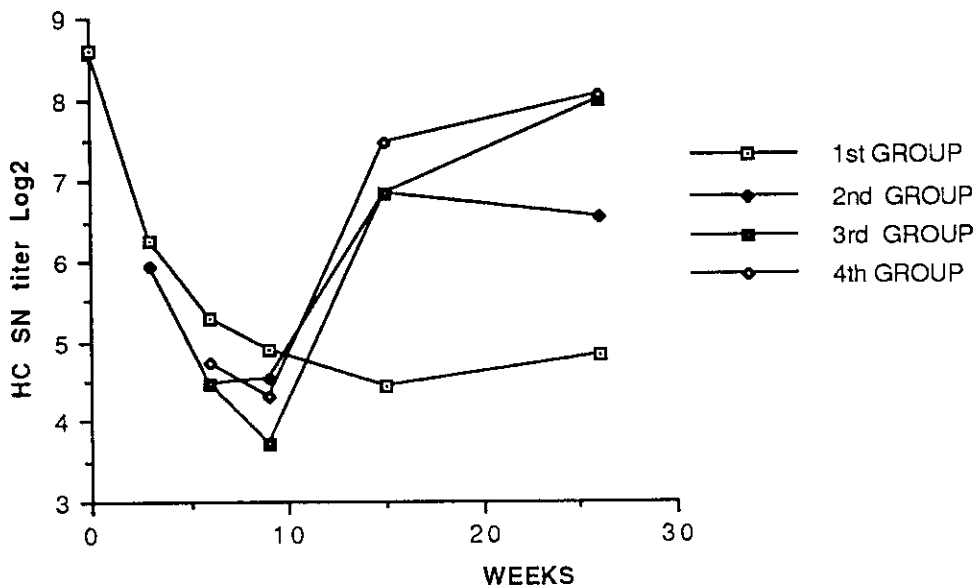


圖 1 仔豬四種豬瘟免疫方式免疫前後豬瘟中和抗體消長圖。

註：1st Group — 第一組：一日齡及三、六週齡免疫

2nd Group — 第二組：三、六週齡免疫

3rd Group — 第三組：六週齡免疫

4th Group — 第四組：六、九週齡免疫

討 論

本省小豬之豬瘟免疫適期可分為三期，在 1979 年前採取六、九週齡兩次免疫注射^[2]；1979 年後，賴等認為可能因豬假性狂犬病病毒的普遍感染致使小豬豬瘟移行抗體的普遍降低，同時因養豬技術提升仔豬離乳時間提前至四週齡，故而將小豬免疫計畫往前挪為三、六週齡免疫注射兩次^[12, 13, 14]；而在 1980 年後，為避免移行抗體干擾疫苗的免疫作用，後續推出哺乳前免疫方式且一時認為對於豬瘟污染場的效果很好^[15]。但由本省豬瘟仍然不斷零星發生，顯示這三種免疫方式各有其缺失所在。依據筆者臨床豬瘟病例實驗室診斷結果顯示，六、九週齡兩次免疫注射，雖然免疫效果極佳，但由於小豬的移動未予適當管制致使豬瘟常發生於小豬四至六週齡的階段。而哺乳前的免疫方式，雖可避開移行抗體的干擾，但又由於剛出生仔豬其腸間淋巴結發育尚未完全整個免疫機能也不健全呈現生理性免疫不全狀態，且新生仔豬血液中富含具有免疫抑制作用的甲型胎兒蛋白（Alpha Fetal Protein; AFP），因此哺乳前免疫注射小豬產生之免疫反應較差，在遇上豬瘟強毒後容易產生脾梗塞豬瘟病變，並可能呈保毒狀態和散播病原^[4, 7, 8]。致於現行三、六週齡兩次免疫注射，部份小豬，尤其是豬瘟污染場小豬由於移行抗體過高雖經免疫注兩次仍無法產生完全的免疫效果，致使豬瘟的發生有移轉至 9~15 週齡肥育豬的趨勢。而目前本省小豬之豬瘟免疫方式更為多樣化^[15, 6]。

本次試驗，係利用無豬瘟發生場仔豬，實施 1. 一日齡和三、六週齡， 2. 三、六週齡， 3. 六週齡， 4. 六、九週齡等四種豬瘟免疫方式注射。結果，雖然四組試驗豬隻的豬瘟中和抗體都可持續至六月齡上市時，但經比較後不難發現，實施後期免疫注射的試驗豬隻，即六週齡免疫，和六、九週齡免疫的兩組豬隻要比實施早期免疫注射的試驗豬隻，即一日齡、三、六週齡免疫，和三、六週齡免疫的兩組豬隻更能獲致健全的免疫效果。

實施後期免疫注射的仔豬，無論是六週齡時免疫注射一次，或者是六、九週齡時免疫注射二次，結果相似。豬瘟中和抗體幾何平均力價均於九週齡時降至最低，爾後兩組都持續上升至六月齡上市時，分別為 256 倍和 265 倍。而實施早期

免疫注射仔豬，於六月齡上市時，豬瘟中和抗體幾何平均倍數則顯然較低。一日齡、三、六週齡免疫三次的試驗豬隻為 29 倍，而三、六週齡免疫二次的試驗豬隻也只有 93 倍。顯示越早實施免疫注射豬隻到達上市時其豬瘟中和抗體價越低。

一日齡、三、六週齡免疫組試驗豬隻，豬瘟中和抗體力價偏低，無法上升原因，除一日齡免疫注射時受到高力價移行抗體的嚴重干擾外，可能是因一日齡的小豬其免疫機能尚未發育完全^[4, 7, 8]，及免疫系統淋巴細胞分化尚未完全^[9, 16]有關。因此，在免疫注射後容易造成免疫耐受性的現象，而使往後三、六週齡時再給予同質病毒的補強注射也無法提升豬隻的抗體力價，即所謂的免疫反應不應答。這種一日齡三、六週齡免疫注射後所引發的免疫不全情況與哺乳前免疫注射結果極為類似。當異質性的豬瘟強毒侵入後，雖能全部耐過且因異質性病毒的刺激而加速抗體力價的上升，然而在耐過前部份豬隻會有低力價的病毒血症及豬瘟病變的形成，甚至呈保毒狀態^[4, 7]。對於未來豬瘟撲滅工作的進行會有負面的影響。因此，我們認為在豬瘟撲滅計畫所列小豬宜統一採取六週齡免疫注射一次，同時限制 25 公斤以下小豬的移動，係屬正確的。同時為防止免疫不全豬隻於遭受豬瘟強毒感染後引發帶毒豬隻的存在，而徒增撲滅豬瘟工作的困擾，應停止實施哺乳前及一日齡、三、六週齡的早期豬瘟免疫注射。

參考文獻

1. 何維莊、黃天祥、賴秀穗。豬瘟疫苗免疫仔豬適期的研究。J. Chinese Soc. Vet. Sci. 17: 89-96。1991
2. 林再春、謝竹茂、陳由昌、陳正吉、李正雄、賴秀穗。本省小豬之豬瘟移行抗體分佈情形及移行抗體與活毒疫苗接種後免疫產生之關係。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 6: 11-12。1969
3. 林再春、李崇道。免化豬瘟疫苗種毒 LPC 株之開發研究綜合報告。轉刊國科會專案報告第五號。1983
4. 黃天祥、林有良、陳聖怡、潘居祥、李淑慧、楊揚輝、潘英章。本省豬瘟免疫方式之探討。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告。No. 29: 23-31。1993

5. 黃天祥、陳聖怡、陳金蘭、林有良、楊揚輝和劉培柏·豬瘟防疫監控研究 (I). 臺灣省家畜衛生試驗所編印八十四年度試驗研究報告書·61-77頁。1995
6. 黃天祥、陳聖怡、陳金蘭、林有良、黎南榮和劉培柏·豬瘟防疫監控研究 (II). 臺灣省家畜衛生試驗所編印八十四年度試驗研究報告書·459-476頁。1995
7. 劉培柏、黎南榮、費昌勇、邱仕炎。哺乳前及哺乳後新生仔豬之豬瘟免疫。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告。No. 23 : 109-119。1987
8. Alken. J. M., Blore. I. C. Immunology of new born pigs : response to lapinized hog cholera virus in colostrum deprived and suckling pigs. *Am J. Vet. Res.*, 25 : 1134-1139. 1964
9. A. T. J. Bianchi, Zwart. R. J., Jeurissen, S. H. M, and Moonen-Leusen. H. W. M, Development of the B- and T-cell compartments in porcine lymphoid organs from birth to adult life : an immunohistological approach. *Vet. Immunology and Immunopathology*, 33 : 201-221. 1992
10. Dune, H. W., Hokanson. J. F., and Luedke. A. J, The pathogenesis of hog cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. *Am. J. Vet Res.*, 20 : 615-618. 1957
11. Lai, S. S., Ho, W. C., Huang, T. S., Wan S. and Lin, T. C, A simple and rapid microtiter procedure for END method to determine hog cholera antibody titers. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*, 2 : 109-111. 1978
12. Lai, S. S., Ho. W. C., Lin, L. P., Persistent infection of pseudorabies virus influenced the efficacy of hog cholera immunization. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*, 13 : 173-180. 1987
13. Lai, S. S., Chen, C. S., Huang, T. S., Ho, W.C., Wang, J. T., Wu, F. M. Immune response of pigs with different levels of colostral antibody to inoculation with LPC-China strain of hog cholera vaccine. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*, 6 : 77-81. 1980
14. Lai, S. S. and Ho, W. C. Immunity of pseudorabies virus naturally infected sows. *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*, 16 : 187-192. 1990
15. Lee, R. C. T., Wang, J. T., Lai, S. S., Wu, F. M. and Lin, Tracy T. C. Study on precolostral vaccination against hog cholera by using an attenuated virus, LPC-China strain. *Proceedings, 6th IPVS Congress*, 133. 1980
16. P. Joling, Bianchi, A. T. J., Kappe, A. L., and Zwart, R. J., Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet. Immunology and Immunopathology*, 40 : 201-221. 1994
17. Wengler G. Flaviviridae. In: Francki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (eds). *Classification and nomenclature of virus. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of virus.* Springer, Wien New York, *Arch Virol (Suppl 2)*, P223-233. 1991

Assessment of the current hog cholera vaccination programs for piglets

Huang, T. S.,* W. J. Tu., M. H. Jong and P. P. Liou

Taiwan Animal Health Research Institute.

SUMMARY Fifty-seven piglets, farrowed by the vaccinated sows in a hog cholera free pig farm, were divided into four groups. The first group was consisted of 16 neonates, were vaccinated with a dose of LPCV vaccine each time at one day old and at 3 and 6 weeks of age. The 15 piglets in the second group were vaccinated two times at 3 and 6 weeks of age. For the third group, 13 piglets were only vaccinated at 6 weeks old. The other 13 piglets in the fourth group were vaccinated two times at 6 and 9 weeks of age. After vaccination, all the pigs in the four groups induced active immunity and serum neutralization antibodies could last to 6 monthes old. The geometric means of serum neutilization titer at 6 monthes of age, tested with END method, were 29 X, 93 X, 256 X and 265 X, respectively. The result showed that the earlier vaccination of piglets the lower antibody was lasted to 6 monthes for market.

Key words: *Hog Cholera, Antibody*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.