

豬 瘟 黏 膜 免 疫

黃天祥* 陳聖怡 林有良 潘居祥
李淑慧 楊揚輝 潘英章

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 47 頭及 34 頭分別於二至七週齡與二至五週齡間施行鼻腔接種或口服牛初乳後服一劑量兔化豬瘟疫苗等兩種黏膜免疫方式之健康小豬，於十週齡行肌肉接種強毒攻擊和同居感染攻擊結果，免疫耐過率各約 36% 及 5.8%，效果並不一致；而施行 3、6 週齡免疫之 47 頭仔豬，十週齡時不論施行肌肉攻擊或同居感染攻擊，均 100% 耐過。顯示豬隻經由鼻腔接種或口服方式單一次免疫兔化豬瘟疫苗並無法產生一致性免疫效果，即無法完全防止豬瘟病毒的感染。

關鍵詞：豬瘟，黏膜免疫

緒言

豬瘟係本省豬隻重要病毒性傳染病之一，歷年來一直影響養豬事業的發展至鉅。由本省開發之防疫用兔化豬瘟疫苗，安全性雖高並且免疫效力優良，三十多年來對豬瘟防疫貢獻很大，但卻仍無法完全防止豬瘟的發生^[4]。分析其因，主為小豬預防注射時常受移行抗體干擾的結果^[1,3,7]。因此，本試驗目的即在尋求健全之豬瘟免疫方式，祈能藉由鼻腔接種或口服疫苗之方式以消除移行抗體的干擾，而使尚在哺乳中之幼齡動物能即早建立主動性免疫。

材料與方法

兔化豬瘟疫苗 (LPCV)：係臺灣省家畜衛生試驗所製造並經檢定合格者。製造批號為 2388。供豬瘟免疫試驗豬之接種及測定血清抗體時製備抗原盤用。

豬瘟 ALD 強毒：係臺灣省家畜衛生試驗所檢定分所之疫苗檢定豬攻擊用強毒。豬隻繼代數為 46 代毒，供攻擊對照豬之接種和測定血清抗體時製備抗原盤用。ALD 毒血力價為 $10^{6.0}$ MLD/ml，即為 $4.25 \times 10^{7.0}$ PFU/ml，攻擊接種用時再以細胞培養液稀釋為 1,000 倍後每頭豬肌肉注射 1 ml。

豬睪丸株化細胞：供間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗時病毒分離及血清抗體測定時製備抗

原盤用。

間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗 (Indirect Immunoperoxidase Plaque Staining: IIPS)：

本試驗方法用以測定病毒力價和血清抗體價，請參閱何等及潘等報告^[2,9]。

試驗一：

47 頭由新女豬與經產母豬分娩之健康小豬（第一胎有 18 頭，第四和第六胎各 10 頭，而第十胎者有 9 頭），隨意分為六組並分別於二至七週齡時經由鼻腔接種或先行口服 4 ml 牛初乳後再行口服一劑量兔化豬瘟疫苗，待十週齡時另同 4 頭未經豬瘟疫苗免疫豬利用豬瘟強毒肌肉接種攻擊。攻擊後，觀察臨床反應、病毒血症以確定其免疫效果。

試驗二：

34 頭由新女豬和經產母豬分娩之健康小豬（第一胎者 10 頭，第三胎和第五胎者各 12 頭），隨意分為四組並分別於二至五週齡時經以鼻腔接種或先行口服 4 ml 牛初乳再行鼻腔接種一劑量兔化豬瘟疫苗，待十週齡時，利用 8 頭未經豬瘟疫苗免疫豬肌肉接種豬瘟強毒並分別共飼於 34 頭免疫豬群內，實施較合於自然界感染模式之同居感染攻擊。攻擊後，觀察臨床反應、病毒血症以確定其免疫效果。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

試驗三：

47 頭由新女豬和經產母豬分娩之健康小豬，分別於3、6 週齡時實施現行之豬瘟免疫注射二次，待十週齡時其中 31 頭直接以豬瘟強毒肌肉接種攻擊；而另外 16 頭免疫豬則分成四組飼於 4 欄豬舍，每欄豬舍同時放入 1 頭經豬瘟強毒肌肉接種之攻擊對照豬實施同居感染攻擊試驗。攻擊後，觀察臨床反應、病毒血症和病理變化以比較現行免疫小豬不同攻擊方式之差異性。

結果

試驗一：

47 頭小豬分別於二至七週齡時經以鼻腔接種或先行口服牛初乳再口服一劑量免化豬瘟疫苗，而十週齡時再以豬瘟強毒肌肉接種攻擊。結果僅有 17 頭豬耐過，其免疫效力約為 36% (17/47)。這 17 頭黏膜免疫攻擊耐過豬，臨床上除其中 8 頭（約 47%；8/17）在攻擊後第五天左右曾有一至二天暫時性熱反應（40.0 °C~41.5 °C）外，皆健康地耐過。攻擊後

第 4、8、14 和 21 天採血分離病毒結果均無病毒血症發生；而攻擊前即十週齡時以及攻擊後第 7、14、21、34 和 47 天採血分離血清並以 ALDV 抗原盤和 LPCV 抗原盤實施間接免疫酵素標識抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果，經攻擊 34 天以前均無抗體反應產生，但第 47 天時以 ALDV 抗原盤測定結果有 7 頭呈現陽性反應，抗體力價在 810~2,430 倍間。

其餘 30 頭黏膜免疫豬，則與 4 頭攻擊對照豬一樣，經肌肉接種豬瘟強毒攻擊後分別在三至五天起開始發病並呈典型豬瘟斃死。攻擊後第 4、8、14 和 21 天全部斃死前採血分離病毒結果，均呈病毒血症陽性；而攻擊前即十週齡時以及攻擊後第 7、14 和 21 天全部斃死前採血分離血清並以 ALD 抗原盤和 LPCV 抗原盤實施間接免疫酵素標識抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果均無血清抗體反應發生。

此一結果顯示，無論是新女豬或經產母豬分娩之小豬（分別有 6 頭和 11 頭耐過），或者經由鼻腔接種或口服免疫小豬，或是小豬之免疫週齡皆與免疫效力無關（參表一）。

表一 鼻腔接種或口服免化豬瘟疫苗黏膜免疫豬肌肉接種豬瘟強毒攻擊結果

免疫週齡	免疫方式	攻擊耐過情形（耐過頭數/免疫攻擊頭數）		
		各組耐過頭數	小計	總計
二週齡	鼻腔接種	1/4	3/8	17/47
	□ 服	2/4		
三週齡	鼻腔接種	1/4	1/8	
	□ 服	0/4		
四週齡	鼻腔接種	3/4	6/8	
	□ 服	3/4		
五週齡	鼻腔接種	2/3	3/7	
	□ 服	1/4		
六週齡	鼻腔接種	2/4	4/8	
	□ 服	2/4		
七週齡	鼻腔接種	0/4	0/8	
	□ 服	0/4		

試驗二：

34 頭來自新女豬與經產母豬分娩之健康小豬分別於 2 至 5 週齡時經以鼻腔接種或先行口服牛初乳再行鼻腔接種 1 劑量免化豬瘟疫苗，而於十週齡時實施同居感染攻擊。結果僅有 2 頭豬耐過，耐過率僅約為 5.8 % (2/34)。2 頭耐過豬中，一頭係 2 週齡時免疫，經同居感染攻擊後除第 9 至 11 天間曾有一熱反應外，臨床上健康耐過，而攻擊後第 6、8、10、14 和 17 天採血分離病毒結果並無病毒血症發生；另一頭耐過豬係 3 週齡時免疫，攻擊後無任何反應地耐過，唯攻擊後第 10 和 14 天則有病毒血症發生，病毒力價分別為 2.18 和 4.87 Log PFU/ml。這兩頭耐過豬，在攻擊前以及攻擊後第 7、14 和 21 天採血分離血清利用 ALDV 和 LPCV 抗原盤實施間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果均無抗體反應發生，而攻擊後第 42 天予以犧牲亦無豬瘟肉眼病變。

其餘 32 頭粘膜免疫豬則分別在同居感染攻擊後第八至十天起相繼呈現持續性熱反應、病毒血症和典型豬瘟斃死；病毒血症在攻擊後第 6、8、10、14 和 17 天平均力價分別為 $0, 1.55 \pm 0.93, 2.69 \pm 1.21, 4.98 \pm 1.08, 5.65 \pm 1.03$ Log PFU/ml。

這些黏膜免疫攻擊斃死豬，在實施同居感染攻擊時及攻擊後斃死前利用 ALDV 和 LPCV 抗原盤以間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果均無抗體反應發生。此外，8 頭攻擊對照豬，則在肌肉接種豬瘟強毒後 3 至 4 天起呈典型豬瘟斃死，攻擊後第 6、8、10、14 和 17 天，病毒血症力價平均分別為 $6.13 \pm 0.70, 6.97 \pm 0.88, 5.37 \pm 0.63, 5.41 \pm 0.90, 6.55 \pm 1.02$ Log PFU/ml。

試驗三：

47 頭來自新女豬與經產母豬分娩之健康小豬，分別於 3、6 週齡時實施現行豬瘟免疫，待十週齡時，其中 31 頭直接以豬瘟強毒攻擊；而另外 16 頭則實施同居感染攻擊結果如下：

直接以豬瘟強毒攻擊之 31 頭豬，臨床上除 11 頭，約為 37 % (11/31)，在攻擊後第五天左右曾有一短暫性熱反應外，全部健康耐過，免疫效力達 100 %。與前人報告者同。攻擊後第 6、8、10 和 17 天採血分離病毒結果均無病毒血症發生，而攻擊前以及攻擊後第 6、8、14、21 和 28 天採血分離血清利用 LPCV 抗原盤以間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果，攻擊前即有抗體反應，幾何平均力價為 51 倍。抗體價在攻擊後一週即告上升，

平均為 535 倍，並於 3、4 週時達最高平均分別為 12,246 和 12,812 倍。

實施同居感染攻擊之 16 頭豬，臨床上除有 14 頭豬，87.5 % (14/16) 在同居感染攻擊後第 11 天左右有 1 至 3 天不等時間之暫時性熱反應 ($40.0^{\circ}\text{C} \sim 41.5^{\circ}\text{C}$) 外，全部健康耐過，保護作用亦達 100 %。同居感染攻擊後第 6、8、10、14、17 和 23 天採血分離病毒結果並無病毒血症發生，而攻擊前以及攻擊後第 6、14 和 23 天採血分離血清利用 LPCV 抗原盤以間接免疫酵素標幟抗體病毒灶染色試驗測定血清抗體結果，攻擊前即有抗體反應，幾何平均力價為 56 倍。抗體價一般須在同居感染攻擊後 2 週方有上升現象，並在 2 至 3 週時達最高，平均分別為 3,765 和 11,585 倍。

試驗中之 4 頭攻擊對照豬，在經肌肉接種豬瘟強毒後 3 至 4 天起呈持續性熱反應之典型豬瘟斃死，攻擊時及攻擊後斃死前均無法利用 LPCV 抗原盤測出抗體力價 (<32 倍)。

討論

經由鼻腔接種或口服粘膜免疫豬，在實施同居感染攻擊後其免疫效果要比直接實施肌肉接種攻擊者差。豬瘟粘膜免疫豬，經肌肉接種強毒攻擊結果可獲 36 % 免疫效力，但經同居感染攻擊結果只有 5.8 % 保護作用。此種結果顯示，單一次之鼻腔接種或口服粘膜免疫並無法產生一致性的免疫作用；而實施同居感染攻擊時可能由於對照豬所排出之病毒均屬豬瘟強毒，致使本組試驗仔豬出現明顯偏低之耐過率。

經由鼻腔接種或口服一劑量免化豬瘟疫苗之粘膜免疫豬，十週齡攻擊時以及攻擊後五週內並無 IIPS 抗體產生，顯示這些粘膜免疫豬可能因受到移行抗體干擾致使疫苗毒無法侵入豬隻體內產生液遞性免疫和記憶反應。唯仍有部份粘膜免疫豬 (36 % 和 5.8 %) 能健康耐過豬瘟強毒的攻擊。這可能係因豬瘟病毒無論經由何種途徑感染病毒，需先經扁桃腺黏膜之腺窩上皮細胞增殖，再轉移到各淋巴結及臟器造成全身感染^[6,8,10,11]，而粘膜免疫一旦產生，其分泌性 S IgA 之 B 細胞會游走至全身各部黏膜包括扁桃腺^[5]，阻滯病原侵入其他臟器致獲部份免疫效果。

試驗三結果顯示現行 3、6 週齡免疫小豬無論直接經由肌肉接種豬瘟強毒或者實施同居感染攻擊都能耐過豬瘟強毒的攻擊，其免疫效果均達 100 %，與

前人報告相似^[3,4,7]表示現行 3、6 週齡豬瘟免疫方式確屬正確，即可建立豬瘟之免疫性，頗適用於無豬瘟發生之豬場。而此種免疫方式於豬瘟污染場之適用性則尚有爭議之處，即無法完全防止豬瘟的散發。依據以往小豬移行抗體調查及試驗報告顯示，小豬在 3 週齡時單一次肌肉免疫注射免化豬瘟疫苗時因受母源移行抗體干擾結果，免疫效力僅約為 90%^[1,3,7,12]。這也顯示，其餘受移行抗體干擾而無法建立主動免疫之 10% 左右小豬，在易遭受豬瘟病毒感染之污染場內於 6 週齡再行第 2 次補強注射前極有可能會因移行抗體的降低而遭受豬瘟病毒的感染而發病。這正說明本省豬瘟何以無法撲滅而每年發生率維持在 0.02% 左右的原因。因此，目前本省小豬之豬瘟防疫政策在乾淨豬場應續循現行 3、6 週齡之免疫方式，以防止場內豬瘟的發生，而污染場之免疫方式則有待更進一步的修正與研發。

致謝 本報告係在農委會 81 - 農建 - 12.2 - 牧 - 33 及 82 科技 - 2.21 - 牧 - 23 (14) 補助下得以完成。

參考文獻

1. 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。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 6 : 11 - 12, 1969.
2. 何維莊、黃天祥、費昌勇、邱仕炎、潘英章。應用酵素標識抗體病毒灶染色法測定豬瘟病毒及抗體。中華民國獸醫學會雜誌。14 : 81 - 87, 1988.
3. 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.
4. 黃天祥、林有良、陳聖怡、潘居祥、李淑慧、楊揚輝和潘英章。本省豬瘟免疫方式之探討。台灣省畜衛所研報 29 : 23 - 31, 1993.
5. Bienenstock J, Befus AD. Immunology 41 : 249, 1980.
6. Kresse JI, Stewart WC, Carbrey EA, Snyder ML. Sensitivity of swine buffy coat culture to infection with hog cholera virus. Am J Vet Res 37 : 1315. 1976.
7. Lai SS, Chen CS, Huang TS, Ho WC, Wang JT, Wu FM. 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.
8. Loan RW, Gustafson DP. Persistent infection of subculturable swine buffy coat cells with hog cholera virus. Am J Vet Res 25 : 1120, 1964.
9. Pan IC, Huang TS, Hess WR. New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African Swine Fever. J. Clinical Micro 16 : 650 - 655, 1982.
10. Ressang AA. Studies on the pathogenesis of hog cholera. I. Demonstration of hog cholera virus subsequent to oral exposure. Zentralbl Veterinaermed (B) 20 : 256, 1973.
11. Ressang AA. Studies on the pathogenesis of hog cholera. II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response. Zentralbl Veterinaermed (B) 20 : 272, 1973.
12. Tracy TC Lin, Robert CT Lee. An overall report on the development of a highly safe and potent lapinized hog cholera virus strain for hog cholera control in Taiwan. NSC Spec. Publ. 5 : 1 - 44, 1981.

Feasibility of the hog cholera vaccination by intranasal or oral route

*Huang, T. S., S. Y. Chern., Y. L. Lin., C. H. Pan.,
S. H. Lee., Y. H. Yang and I. C. Pan.

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

SUMMARY Forty-seven piglets, farrowed and fed by gilts and sows, were divided into 6 groups and inoculated with a dose of LPC vaccine either by intranasal or oral route at 2 to 7 weeks of age, respectively. Piglets each inoculated by the oral route was fed with 4 ml of bovine colostrum just prior to oral inoculation. All pigs were challenge inoculated with ALD hog cholera virulent virus by I. M. at 10 weeks old. The results showed that only 17 piglets (about 36 %) were refractory to the challenge, while another 34 piglets, from gilts and sows, were divided into 4 groups and inoculated with a dose of LPC vaccine by intranasal route or fed with bovine colostrum just prior to inoculation, at 2 to 5 weeks of age, respectively. All 34 pigs were challenged by the contact infection, at 10 weeks of age. The results showed that only 2 piglets (about 5.8 %) were refractory to the contact infection challenge. Either the routes of inoculation or the age, the number of farrowing of pigs seems no influence on immune response. The poor mucosal immunity probably because the stimulation of a immune response by a dose of LPC vaccine was not consistently established.

Forty-seven piglets, born and fed by gilts and sows, were vaccinated by I. M. at 3 ~ 6 weeks of age under the current vaccination program. After second vaccination, 31 pigs were challenge inoculated with ALD virus by I. M., and another 16 pigs were challenged by contact infection, at 10 weeks of age. The results showed that all pigs (100 %) were refractory either to the I. M. inoculation challenge or contact infection. However, the current vaccination program should be tested and revised for the contaminated herds for eliminating the low incidence of hog cholera.

Key words: *Hog cholera; Mucosal immunization*

*Corresponding author

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