

牛傳染性鼻氣管炎不活化疫苗之開發與應用

呂榮修* 李永林 邱仕炎 廖永剛
鄭懋勁 林地發 蔡向榮

台灣省家畜衛生試驗所

經純化株選後之牛傳染性鼻氣管炎病毒，本省分離株一大社株，在牛腎株化細胞(MDBK cell line)增殖後，以0.2% (v/v)福馬林37°C 10小時不活化，再加10% (v/v)磷酸鋁膠製成不活化疫苗。製成之疫苗接種牛隻無不良反應，並且在一次補強後可得16倍之中和抗體力價，結果顯示本疫苗之安全性及免疫效力均極為優異。本疫苗在1987年大規模應用於本病疫區，共接種6473頭牛隻12946劑量，而能有效控制本病疫情。本疫苗穩定性極佳，在4°C保存一年後免疫效力並未降低。

Key words: *Infectious bovine rhinotracheitis, Vaccine.*

牛傳染性鼻氣管炎(infectious bovine rhinotracheitis, IBR)，係由Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)所感染引起之牛急性熱性傳染病，本病常引致牛上部氣道及氣管黏膜之炎症，以呼吸困難流鼻涕等為主要症狀，其他由於病毒之感染部位不同而發生膈炎、龜頭炎等性病、結膜炎、流產、及乳房炎及小牛之髓膜腦炎等多種症狀之疾病[7, 13]，因本病毒具有持續感染之特性，故為世界各國備受重視之疾病。本病在世界各國均有發生，在台灣於1967年Otte [10]報告，從臨床以及疫情觀察認為有IBR之存在，至1974年林敬覆等[3]報告本省中北部7縣市321頭牛中24頭(7.3%)為陽性牛，嗣後1975年林等[4]報告竹南鎮某牧場之6個月齡聖達肉牛病例初次分離到IBR病毒，以後雖有鍾等[5]對台灣乳牛IBR中和抗體之調查報告，但未見有本病之發生報告病例，至10年後之1985年8月於屏東縣K牧場，在組織病理上呈

現非化膿性腦脊髓炎及潰瘍性口炎之2頭斃死牛中分離到IBR病毒，翌年1986年在高雄縣再度爆發IBR造成南台灣之大流行，同時1987年亦因進口牛而引發IBR之流行，此兩次流行，傳播均甚迅速，波及亦廣，造成農戶重大損失[2]，幸而能在短時間內分離病原成功而確診本病，為了能有效控制本病的流行，筆者等以分離毒株在牛腎(Madin-Darby Bovine Kidney；MDBK)細胞增殖，經以福馬林去活化後，添加磷酸鋁膠製成不活化疫苗，茲將所得成績報告如下。

材料與方法

疫苗毒株。係1986年在高雄縣大社鄉疫區由病牛所分離並命名為大社株[2]，經株選純化及固定後供為種毒。本毒株在MDBK株化細胞，初代牛腎及牛睪丸細胞皆能增殖並引起明顯之細

* 抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌, 18(1):41-46., 1992
台灣省家畜衛生試驗所

胞圓形化及空泡化細胞病變(CPE)。本病毒接種無IBR抗體牛隻會致牛隻有發熱，流鼻涕，咳嗽及氣喘等呼吸症狀。

種毒之繼代與保存。種毒係以初代牛腎、牛睪丸細胞或MDBK株化細胞增殖繼代在三代以內者。經以大量增殖一批種毒後分裝保存於-80℃或以凍結乾燥後保存於4℃冰箱中。

不活化疫苗之製造。IBR不活化疫苗製造方式乃選取生長良好的MDBK細胞在37℃迴轉瓶中培養，待形成單層細胞後抽去培養液加入含0.1 M.O.I.病毒液，在37℃暖房迴轉培養，待細胞達80% CPE時收集病毒液，加入0.2% v/v福馬林，在37℃作用10小時將病毒不活化；經無菌試驗及病毒不活化試驗，然後加入10% v/v磷酸鋁膠(由等量之16% Na₃PO₄·12H₂O及10% AlCl₃·6H₂O混合製成)(均為Merck產品)作為疫苗佐劑，並以1N NaOH調整疫苗pH為7.0。經攪拌均質後分裝，並保存於4℃冷藏室中待檢。

疫苗物理及化學性狀檢查

特性試驗。本疫苗須為淡紅色均質液狀物，且無異物及異常氣味。

無菌試驗。以Fluid Thioglycolate Medium (BBL)，Saboraud agar 及 Tryptic soy agar(均為DIFCO產品)分別對疫苗檢測是否含雜菌，同時作塗抹染色鏡檢。檢查結果須為陰性。

蟻醛含量試驗。依一般試驗方法之蟻醛定量法試驗[1]，其蟻醛含量須為0.2% v/v以下。

疫苗之安全試驗及效力試驗

安全試驗。選取無IBR抗體之6個月齡健康小公牛1頭，依本劑之用量及方法，以1劑量(3mL，每mL含10⁷ TCID₅₀ (TCID₅₀))病毒疫苗行肌肉接種，並觀察14日，觀察期間，雖有輕度發熱(40℃以下)但不得持續3日以上，且須無呼吸症狀及其他異狀。

效力試驗。經安全觀察14日，業經判定為合格之試驗牛1頭，於第一次接種疫苗後3-4週再以1劑量(3mL)接種試驗牛。第2次接種後7日，採

取血清供為中和試驗。

中和抗體之測定。中和試驗方法係以被檢血清經非動化後，以病毒增殖用培養基(MEM, pH : 7.0)加以2倍階段連續稀釋，各稀釋血清50 μL與50 μL含200 TCID₅₀的中和試驗用病毒混合，在37℃，60分鐘感作處理後，再加入100 μL細胞懸浮液(每mL含3×10⁶個細胞)，而經覆蓋置37℃培養觀察7日。判定是以培養皿有2孔以上(2/4)呈現阻止CPE的最高稀釋倍數即為血清中和力價。中和抗體力價2倍以上者判定為陽性。

疫苗之田間應用。於1987年1月至3月間經試製IBR不活化疫苗三批供6473頭IBR疫區所在縣市牛隻接種，其供應各縣市使用情形如表1。在第一次接種後四週再補強注射一次，並於免疫前及補強注射兩週採取其中1180頭牛之血清供為中和抗體測定用。

疫苗保存試驗。供試疫苗三批分別在保存3、6、9、12個月後檢查其物理及化學性狀，並各接種2頭無IBR抗體之健康小牛，並於接種後四週補強注射一次，分別在接種後及補強注射後2週採血測定其中和抗體力價。

結 果

疫苗之物理及化學性狀檢查

特性試驗。疫苗經測試是為淡紅色且不具異物及異常氣味之均質溶液。

細菌抽驗。經抽驗疫苗供為雜菌檢定，結果均為陰性。

蟻醛含量測定。經測定疫苗含蟻醛量均在0.2% v/v以下。

疫苗之安全試驗及效力試驗

安全試驗。疫苗接種牛4頭，在觀察期間4週中，並無呈現任何不良反應，顯示試製疫苗安全性極高。

效力試驗。上述經安全試驗的牛4頭，於1次免疫後2週即可測得陽性抗體，並經4週後補強接

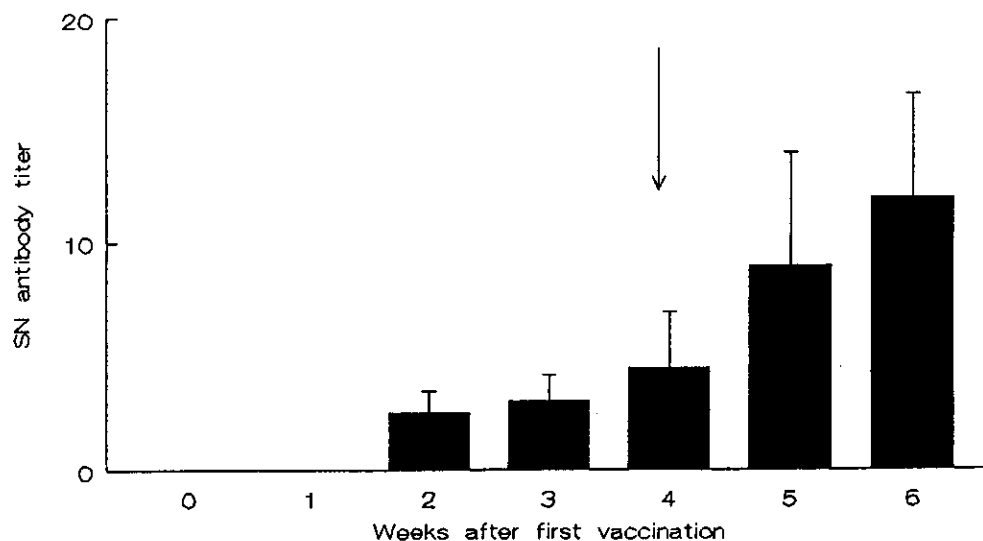


圖1 試製IBR不活化疫苗接種牛隻之抗體反應(平均值±標準差)
(箭頭所指為第二次補強接種時間)。n=4。

表1 IBR不活化疫苗在田間應用試驗成績(1987.1-4月)

| 縣市別 | 接種頭數 | 陽性頭數/檢查頭數(中和抗體價) | 平均價(log ₂) |
|-----|-------------------|-------------------|------------------------|
| 台中縣 | 200 | 181/200 (x2-x8) | 2.1 |
| 南投縣 | 100 | 98/100 (x2-x16) | 2.6 |
| 彰化縣 | 980 | 96/100 (x2-x8) | 2.1 |
| 雲林縣 | 1000 ^a | 181/200 (x2-x8) | 1.4 |
| 嘉義縣 | 365 | 76/100 (x2-x8) | 1.6 |
| 台南縣 | 1095 ^b | 192/200 (x2-x16) | 2.2 |
| 台南市 | 313 | 64/80 (x2-x8) | 1.6 |
| 高雄縣 | 2420 | 191/200 (x2-x16) | 2.2 |
| 合計 | 6473 | 978/1180 (x2-x16) | 2.0 |

a: 含懷孕牛 50頭
b: 含懷孕牛100頭 } 均無流產等不良反應。

表2 供試疫苗保存性試驗及保存期間

| 疫苗批次 | 製造日期 | 保存期間 |
|------|----------|-------------------|
| 1 | 76.1.10. | 76.1.10.~77.1.10. |
| 2 | 76.2.08. | 76.2.08.~77.2.08. |
| 3 | 76.3.10. | 76.3.10.~77.3.10. |

表3 疫苗保存效力試驗

| 疫苗 | 抗體測 | 疫苗保存期間 | | | | | | | |
|----|-------|--|---|--|---|--|---|--|---|
| | | 3個月 | | 6個月 | | 9個月 | | 12個月 | |
| 批次 | 定時間 | | | | | | | | |
| 1 | 中和抗體價 | $\times 2 \times 4 \times 8 \times 16$ | | $\times 2 \times 4 \times 8 \times 16$ | | $\times 2 \times 4 \times 8 \times 16$ | | $\times 2 \times 4 \times 8 \times 16$ | |
| | 免疫後2週 | 1 ^a | 1 | 2 | | 1 | 1 | 2 | |
| | 補強後2週 | | 2 | 2 | | 1 | 1 | 2 | |
| 2 | 免疫後2週 | 1 | 1 | 2 | | 2 | | 1 | 1 |
| | 補強後2週 | | 1 | 1 | | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 3 | 免疫後2週 | 2 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | |
| | 補強後2週 | | 1 | 1 | | 2 | | 1 | 1 |

a：代表牛隻數目，每3個月抽取疫苗3支接種小牛2頭，測定IBR抗體力價。

種的牛隻其中和抗體力價可達16倍，4隻接種牛之平均抗體力價為 12 ± 4.6 ，而對照牛均無抗體反應(圖1)。顯示該疫苗經接種牛隻後，可刺激牛隻產生良好的免疫效應。

疫苗田間應用試驗。本疫苗田間應用之情形如表1，經接種疫苗之本病發生牛場疫情均能被有效控制，未再有IBR病牛發生。而接種牛隻中有150頭懷孕牛亦未有流產等不良反應發生，即疫苗之效力與安全性皆佳。接種牛隻在免疫前之中和抗體價為 $< 2x-2x$ ，經二次疫苗接種後可提升4至8倍之抗體力價。

疫苗保存試驗。供試疫苗及保存試驗期間分別如表2所示。結果疫苗於保存期間皆能保存原有疫苗之淡紅色均質溶液，並且於保存期間也無任何可檢出之雜菌。供試疫苗三批分別於保存3、6、9、12個月後各接種2頭牛，於免疫後2週及補強注射後2週採血，測定其中和抗體。經定期選取無IBR抗體之健康小牛2頭做疫苗之安全試驗及效力試驗，結果接種牛隻在接種後2週抗體可分別升高至2倍或4倍，並經免疫後4週再補強1次之抗體力價亦可達8倍或16倍(表3)，即顯示本疫苗在保存期間顯具安全性，同時在效力上也具有足夠維持刺激牛隻產生免疫效應能力。

討 論

Bovine herpesvirus type 1(BHV-1)係牛隻最重要的疱疹病毒，可引起流產、外生殖器感染、結膜炎、腸炎、腦炎及小牛的致死性全身性疾病[11, 13]。在國外有活毒疫苗及不活化疫苗為本病防疫之用。活毒疫苗雖可有效的預防呼吸道疾病的發生，但是當肌肉注射於懷孕牛隻時常引起流產，雖然以鼻腔內接種的方法不會引起流產，但是此種接種方式不實用。另外活毒疫苗亦有接種牛隻會排毒及有變成潛伏感染而在受到緊迫時再發病的可能性[7, 8, 9, 11]。因此在1987年本省發生IBR流行時活毒疫苗並未被考慮用來控制本病。

不活化疫苗雖些沒有安全性及潛伏感染的問題，但是必需有較高的病毒抗原，而且往往必需接種2次或以上以激起足夠的免疫反應[13]。筆者等以本省分離株IBR病毒所研製之不活化疫苗經接種二次後，牛隻之中和抗體可達8-16倍力價，效果頗佳。因IBR中和抗體之存在與臨床上疾病的保護是一致的，牛隻的中和抗體只要能中和100個細胞感染劑量(TCID)的病毒即認為具有免疫力[13]，故本疫苗之免疫效果雖未做免疫牛隻之攻毒試驗，但由接種牛

隻之中和抗體力價及在田間大規模的應用結果可以證明其免疫效力極佳。又接種牛隻並未有不良反應發生，尤其150頭懷孕牛接種後亦未發生流產，所以本不活化疫苗之安全性亦佳。

IBR不活化疫苗如未妥善使用，免疫牛隻未有足夠抗體抵抗田間病毒之感染時，可能會發生輕微的疾病後而有潛伏感染發生[6]，因此免疫牛隻需使維持高中和抗體力價。據Sweet [12]之報告，牛隻在接種二劑量不活化疫苗後一年中和抗體力價雖持續下降仍持續存在，此時以一劑量不活化疫苗接種，可引起記憶性(anamnestic)抗體反應，因此建議以IBR不活化疫苗接種2劑量之牛隻，以後每年補強一次即可維持具保護力的中和抗體力，此免疫方式應可供本省牛隻防疫之參考。

參考文獻

1. 無名：動物用生物學的製劑基準。動物用生物學的製劑協會印行，日本。P.329, 1989。
2. 呂榮修、鄭懋勁、廖永剛、李永林、邱仕炎、林地發、李全：牛傳染性鼻氣管炎之疫情調查與病毒分離。中華獸醫誌15：281-290, 1989。
3. 林敬覆、邱朝齊、呂榮修、鍾明華、林榮培、詹益波、黎南榮、鄭建盛、王雅娟、陳守仕：台灣乳肉牛病毒性疾病IBR, PI-3及ADENO-1之抗體調查。台灣省畜衛試研報11：57-62, 1974。
4. 林敬覆、邱朝齊、呂榮修、詹益波：從罹患呼吸道疾病之牛隻分離IBR病毒及其性狀檢討。台灣省畜衛試研報1：61-68, 1975。
5. 鍾明華、邱朝齊、林榮培：台灣牛隻病毒性呼吸道疾病研究 牛隻微量血清中和抗體調查研究。台灣省畜衛試研報14：65-72, 1977。
6. Frerichs G N, Woods S B, Lucas M H, Sands J J: Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Vet Rec* 111: 116-122, 1982.
7. Kahrs R F: Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update, *JAVMA* 171: 1055-1064, 1977.
8. McFeely R A, Merritt A M, Stearly E L: Abortion in a dairy herd vaccinated for infectious bovine rhinotracheitis. *JAVMA* 153: 657-661, 1968.
9. Mckercher D G, Wada E M: The virus of infectious bovine rhinotracheitis as a cause of abortion in cattle. *JAVMA* 144: 136-142, 1964.
10. Otte E: Virus disease of cattle in Taiwan. *J Taiwan Assoc Anim Husband Vet Med* 12: 1-22, 1968.
11. Sheffy B E, Rodman S: Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. *JAVMA* 163: 850-851, 1973.
11. Sweat R L: Persistence of antibodies and anamnestic response in calves vaccinated with inactivated infectious bovine rhinotracheitis virus and parainfluenza-3 virus vaccine. *JAVMA* 182: 809-811, 1983.
13. Timoney J F, Gillespie J H, Fredric W S Barlough J E, Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals*, 8th ed, Cornell University Press, Ithaca and London. 593-604, 1988.

The Development and Field Application of an Inactivated Infectious Bovine Rhinothracheitis Vaccine

Yong-Siu LU*, Yong-Lin LEE, Shu-Yen CHIU, Yung-Kung LIAO,
Mau-Jinn KWANG, Dih-Fa LIN, and Hsiang-Jung TSAL.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

An inactivated infectious bovine rhinothracheitis (IBR) vaccine was developed using a local isolate as seed virus. The virus was propagated on Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cell line, inactivated with 0.2% formalin (v/v) at 37°C for 10 hours, and then mixed with 10% aluminum phosphate gel (v/v). The inactivated IBR vaccine was safe and effective. In 1987, total of 6,473 cattle were immunized with the vaccine twice at a 4-weeks interval. No adverse reaction was observed in immunized cattle. The epizootic of IBR in Taiwan was successfully controlled. The inactivated IBR vaccine was stable and maintained its immunogenicity after being stored at 4°C for one year.

*Corresponding author