

本省野外豬瘟病毒性狀之分析

劉培柏 黎南榮 邱仕炎

台灣省家畜衛生試驗所

以本省野外分離之豬瘟病毒12株，並以檢定疫苗攻毒用ALD株為對照，各株接種無抗體或抗體極低($< \times 8$)之8週齡未經疫苗免疫之豬隻2頭，除台南II株於接種後，第24天及第26天斃死外，其餘各野外毒株之接種豬隻都在第12至第18天斃死。對LPC株疫苗免疫豬之攻毒試驗，除雲林株有發熱外，其餘各株都無臨床症狀及剖檢病變。對家兔耳靜脈接種之熱反應試驗，除台南II株呈現熱反應及雲林株斃死外，其餘各株反應都為陰性。以細胞培養及螢光抗體技術證實雲林株混有豬假性狂犬病病毒。各野外病毒株於初代豬單丸細胞之增殖，第4天培養液中之病毒量最高，ALD株和台南III株分別可達 $10^{6.0}$ 及 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml，其餘各毒株，僅能達 $10^{2.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml。

豬瘟為本省最重要的豬隻傳染病，威脅養豬生產甚鉅，雖然使用LPC株兔化豬瘟病毒疫苗能予以預防，但近年來免疫接種後豬隻發生豬瘟件數層出不窮，已形成豬瘟防疫的重大困擾，而防疫之探討，以往都注重於移行抗體之干擾疫苗效力及作仔豬免疫適齡的更改^{1-3,7}。事實上，為解決此一難題，除應加強疫苗效力並改善其使用方法外，探討當前在田間為虐的豬瘟強毒之性狀、病原性及免疫原性，藉以檢討LPC株疫苗對抗野外豬瘟強毒的免疫功能，確為加強豬瘟防疫之急務。

試驗材料與方法

試驗豬隻：購自台灣種畜場，體重20公斤左右，未經豬瘟疫苗注射之8週齡仔豬，血清豬瘟移行抗體含量為 $\times 0 \sim \times 8$ 。

豬瘟病毒株：使用本省野外分離病毒12株及檢定疫苗攻擊用強毒ALD株為對照。12株野外病毒為分離自發生豬瘟的豬場，分別來自宜蘭(3株)，彰化(2株)，嘉義(1株)，雲林(1株)及台南(5株)。採取發病豬

脾臟及扁桃腺，以冷藏方式帶回實驗室。脾臟用含2%胎牛血清之組織培養液作成10%乳劑，經以低速離心，取上清液，以 $0.2 \mu m$ 微孔膜濾過，此濾過液就當成病毒的來源。將脾乳劑濾過液接種PK-15細胞及作扁桃腺之凍結切片，以螢光抗體技術作病毒之分離及確認。標示抗體製作，為以LPC株疫苗免疫之豬隻，再以ALD株作數次大量接種後，所得之高度免疫血清，純化其球蛋白並和FITC螢光色素標示而成。ALD株亦同法採取接種發病豬之脾臟作成乳劑，當為對照用病毒來源。

豬瘟疫苗：使用本所製造之LPC株兔化豬瘟病毒疫苗，作為豬隻免疫用及免熱反應之對照病毒。

豬隻接種試驗：為分析野外分離之病毒株對豬隻的病原性差異，將野外毒株作豬隻接種試驗。每株病毒接種2頭，以脾臟乳劑濾過液2ml，由耳後皮下接種，並以ALD株為對照。接種後，觀察其臨床症狀，病程，大體剖檢及組織切片之病理學檢查。

疫苗免疫豬隻之攻毒試驗：豬隻以兔化豬

瘟病毒 LPC 株疫苗 1 劑量，由耳後皮下注射免疫。免疫後 10 天，再以分離之野外病毒株及實驗室攻擊用 ALD 株病毒作攻毒試驗。每株病毒攻擊 2 頭免疫過的豬隻，以脾臟乳劑濾過液 2 ml，由後肢肌肉接種。攻擊後，詳細記錄臨床症狀，並於 14 天後全數放血撲殺，作大體剖檢及組織病理學檢查。

免熱反應試驗：以 12 株野外病毒，即豬脾乳劑濾過液 2 ml，並以 ALD 病毒為對照，由免隻耳靜脈接種，每株病毒接種 2 頭，每天測量體溫 2 次，接種後第 7 天，全部免隻用本所製造之 LPC 株疫苗種毒，再由耳靜脈接種 1 劑量，繼續測量體溫 5 天。典型之熱反應為接種後 2 天體溫上升至 41℃ 以上，翌日下降至常溫。

野外毒株於培養細胞之增殖：將培養於角瓶（培養面積 175 Cm²）之 2 日齡豬睪丸單層細胞，抽除培養液，放入 1 ml 之野外病毒株及 ALD 強毒對照株之豬脾乳劑濾過液，於 37℃ 中感作 1 小時，並不時搖盪，使其平均分佈於單層細胞上。感作後，以培養液洗滌 2 次，最後置入含 5% 胎牛血清的 MEM（Minimal Essential Medium）培養液，繼續在 37℃ 中培養。於培養第 12, 24 小時及第 2、3、4、5 及第 6 天，抽出 0.5 ml 之上清液，置於小瓶中，保存在 -70℃ 下，預備作病毒增殖之測定。病毒力價之測定：將定時抽取之病毒液，用含 2% 胎牛血清的 MEM 培養液，於試管內作 10 倍稀釋，再用微量滴管移入 96 孔培養平板，每稀釋度病毒液放 4 孔，每孔為 0.1 ml。最後每孔添加初代豬睪丸細胞 0.1 ml，細胞數為 4×10^5 。使用之培養液為含 20% 胎牛血清之 MEM 培養液。最後以透明膠帶密封並培養於 37℃。4 天後，抽除培養液，每孔置入 0.15 ml 的宮寺株新城雞瘟病毒液，病毒含量為 10^6 PFU/ml，再置 37℃ 中培養 3 天後，判定力價，其力價以 Spear-Kärber 法計算。

豬瘟中和抗體測定：豬瘟中和抗體分析，依 Komaniwa 等⁶報告之 END 微量測定法實施。將採取的血液分離血清後，經 56℃，30 分鐘不活化，被測之血清在 96 孔之微量平板內

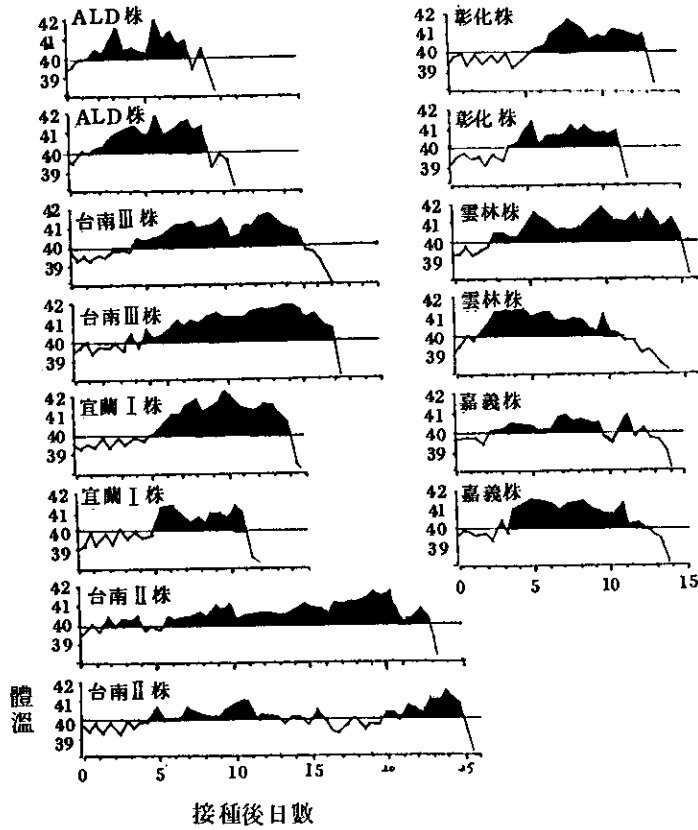
，使用 Toyo 自動稀釋器，作 2 倍連續稀釋，稀釋後加入等量之 A 76 豬瘟病毒，病毒含量 100 TCID₅₀，並振盪混合，置於 37℃ 中感作 1 小時，再加入初代豬睪丸細胞 4×10^6 cells，以透明膠帶封上，而後之步驟及方法，如同病毒力價之測定。

試驗結果

豬隻接種野外分離病毒株：豬隻接種 12 株豬瘟野外病毒及 ALD 株強毒，所有試驗豬隻都呈典型之豬瘟症狀斃死，呈現之症狀包括持續性高熱、食慾不振、無精神、毛髮粗剛、後肢無力，有些豬隻則有嘔吐或下痢。瀕死前的豬隻無法站立，出現神經症狀包括四肢划動、抽搐、昏迷、而猝然死亡。ALD 株強毒接種豬，於接種後第 2 天，體溫即上升，而各野外毒株之接種豬，大部份於接種後第 4~5 天體溫才有顯著的上升反應。這些豬隻之熱反應如圖 1 所示。整個病程呈現持續性高熱而於瀕死前才猝然下降。接種 ALD 株強毒之兩頭豬隻，於接種後 10~11 天斃死。野外毒株則除台南 II 株於接種後，第 24 及 26 日斃死外，其餘野外毒株之接種豬隻則於第 12 至第 18 日斃死。（圖 1）。屍體剖檢，各病毒株之接種豬隻間並無明顯差異；大部份豬隻之內臟及淋巴結出血病變明顯，腎臟和膀胱常可見出血點，有些豬隻則可見脾梗塞。組織病理學檢查，全部豬隻都有明顯的非化膿性腦炎及圍管性病變。

以野外毒株作疫苗免疫豬隻之攻毒試驗：除雲林株攻毒之 2 頭豬隻，臨床症狀為體溫持續上升 3~4 天外（圖 2），而其餘豬隻都無臨床症狀而健存。攻毒後觀察 14 天，全部豬隻予以放血撲殺剖檢，都無肉眼可見之病變，且以組織病理學檢查都為陰性。

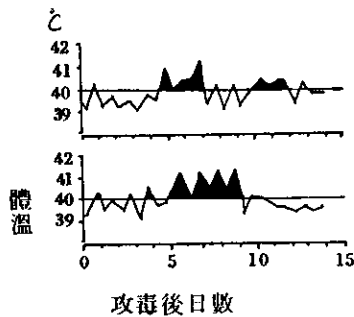
免隻接種野外毒株之熱反應試驗：接種雲林株之 2 頭免隻，第 2 天體溫迅速上升，而於第 6 天全部斃死。接種台南 II 株之免隻，則呈典型之熱反應，並對第 2 次接種之 LPC 株病毒無任何反應。其餘各病毒株及 ALD 株對照強毒，接種後都無熱反應，而對第 2 次接種之 LPC 株病毒，呈典型之熱反應。（圖 3）。



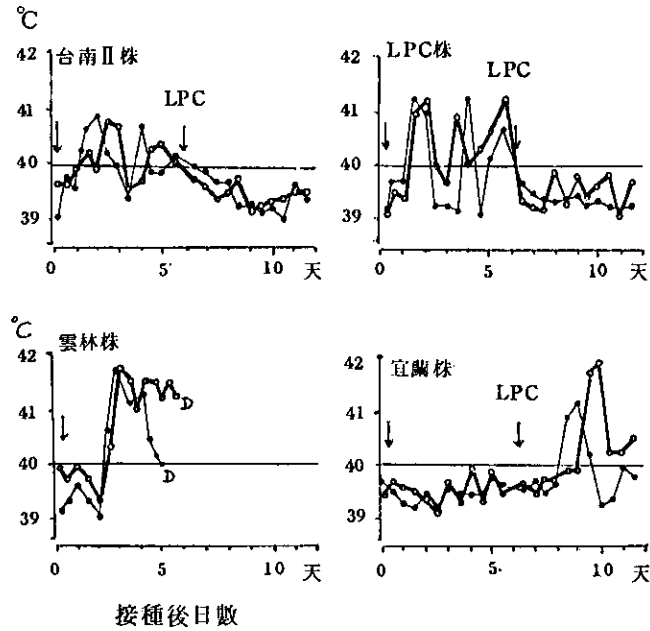
圖一 豬隻接種野外豬瘟病毒株之體溫變化，每株病毒接種 2 頭豬隻

野外毒株於培養細胞之增殖：雲林株於初代豬睪丸培養細胞中，呈現融合性的細胞變性，經以RK 13 細胞再行培養，並以螢光抗體技術證實該豬脾乳劑濾過液存有豬假性狂犬病病毒。各野外毒株及 ALD 株強毒，於初代豬睪

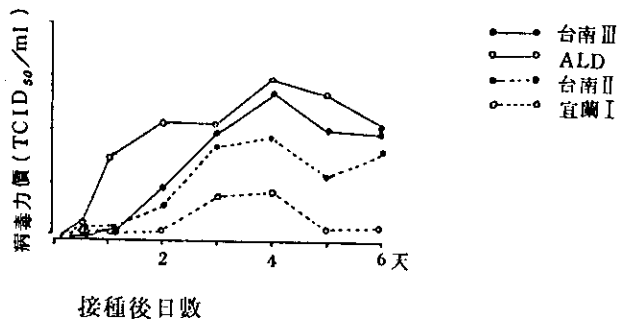
丸細胞之培養液中，都於第 4 天病毒含量最高，ALD 株強毒及台南 III 株，分別可達 $10^{6.0}$ 及 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml。其餘各野外毒株僅能達 $10^{2.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml。(圖 4)



圖二 以雲林株野外豬瘟病毒作 LPC 株疫苗免疫豬隻 2 頭之攻擊試驗，豬隻體溫之變化。



圖三 家兔接種野外豬瘟毒株之熱反應，第7天再行接種兔化豬瘟病毒LPC株每組以2隻兔行體溫測定。雲林株於接種後第6天斃死。



圖四 野外豬瘟病毒株於初代豬睪丸培養細胞之增殖。

討 論

Dunne⁴ 曾以臨床症狀的嚴重性及病程作為豬瘟的分類，將病程 5 天內歸為甚急性型 (Peracute form)，10 ~ 20 天為急性型 (Acute)，20 天以上為亞急性型 (Subacute)，30 天以上為慢性型 (Chronic)。因此根據此分類，本次試驗中之大部份野外毒株及 ALD 株引起的豬瘟為急性型，只有台南 II 株為亞急性型且近似慢性型。於本試驗中，不同的野外豬瘟毒株接種豬隻，其顯現的臨床症狀、病程及解剖病變，大致都和實驗室檢定疫苗攻毒用 ALD 株強毒類似；大部份野外毒株於接種後第 4 ~ 5 天才呈現熱反應，而 ALD 株則於第 2 天體溫就顯著上升。由於這些病毒株都以豬脾乳劑濾過液為來源，因此，ALD 株病毒之毒力顯然比野外毒株為強。

接種台南 II 株之兩頭豬隻，其病程長達 24 及 26 天，接種兔隻又有典型之熱反應，此台南 II 株是否俱有免化豬瘟病毒的特性或分離的野外毒混有免疫注射用之免化豬瘟病毒，原因未明。Uccle⁵ 曾以兔隻作兩次接種來鑑別豬瘟病毒是否為野外毒或免化毒；第 1 次以發病豬病材接種，第 2 次則以中國株免化毒接種，兩次間隔 7 天，若第 1 次接種無熱反應，第 2 次却有，知其為野外毒，相反的則為免化毒。本次試驗中的台南 II 株所呈現的特性，是否意味抗原性的改變，或可進一步使用交叉中和試驗及螢光抗體技術予以究明^{5, 6-10}。

野外毒株於初代豬腎丸培養細胞中增殖，台南 II 株和 ALD 株可達 $10^{6.4}$ TCID₅₀/ml 以上之高力價病毒，而其餘各株病毒含量不高，似乎都仍未能適應於培養細胞之增殖。

以 LPC 株疫苗免疫的豬隻，再以不同野外強毒株攻毒，除雲林株攻擊之 2 頭豬隻有熱反應外，其餘都無反應而健存，其造成之豬隻熱反應，乃因該病毒株內混有豬假性狂犬病病毒。由本試驗結果顯示本省使用多年的 LPC 株疫苗可使豬隻獲得良好的免疫力，足以對抗野外的豬瘟強毒株。

誌 謝

本研究計劃承蒙農委會 75 農建-7.1-牧-26 經費補助。謹此致謝。

參 考 文 獻

1. 林再春，謝竹茂，陳由昌，陳正吉，李正雄，賴秀穗。1969。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。台灣省畜衛試研報。6，11 ~ 22。
2. 楊喜金，賴俊雄，張天桂，劉燃炎，吳義興，詹益波。1971。豬瘟中和抗體之研究，第二報，母猪初乳對豬瘟免疫抗體產生之研究。台灣省畜衛試研報。8：25 ~ 34。
3. 楊喜金，賴俊雄，張天桂，劉燃炎，吳義興，詹益波，劉義雄，陳守仕。1972。豬隻中和抗體之研究。第三報仔豬豬瘟預防注射適當時期之預測。台灣省畜衛試研報。9：21 ~ 41。
4. Dunne, H.W. 1975 Hog cholera in "Dunne, H.W. and Iman, A.D. EDS., Disease of Swine 4th ed", 185-255, Iowa State University Press, Ames, Iowa
5. Kamijo, Y., S.I. Ohkuma, M. Shimizu and Y. Shimizu. 1977 Differences in Pathogenicity and antigenicity among hog cholera. Natl. Inst. Anim. Hlth. Quart., 17 133-140.
6. Komaniwa, H., A. Fukusho and Shimizu. 1981. Micro method for performing titration and neutralization test of hog cholera virus using established porcine kidney celi strain. Natl. Inst. Anim. Hlth. Quart 21, 153-158.
7. Lai S.S., C.S. Chen, T.H. Huang, W.C. Ho, J.T. Wang and F.M. Wu. 1980. Immune response of pigs with different levels of colostrum antibody to inoculation with LPC Chinese strain of hog cholera

- vaccine. J. Chinese Soc. Vet Sci., 6, 77-81.
8. Pirtle, E.C. and W.L. Mengeling. 1971. Antigenic differences in hog cholera virus strains. Amer. J. Vet. Res. 32, 1473-1477.
 9. Shimizu, M. and Y. Shimizu. 1983. Properties of hog cholera viruses recently isolated in Japan. Natl. Anim. Hlth. Quart., 23, 103-104.
 10. Teebken, D.L., J.M. Aiken and M.J. Twiehaus. 1967. Differentiation of virulent, attenuated, and inactivated hog cholera viruses by fluorescent-antibody technique J.A. V.M.A. 150, 53-58.
 11. Uccle, T.J. 1971. Babbit diagnosis of hog cholera. Cholera. Comm. Europ. Communities. P72.

The Characteristics of field Strains of Hog Cholera Virus Isolated in Taiwan

P.P. Liou, N.J. Li, S.Y. Chiu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Eight week old pigs with low ($\ll x8$) or free of hog cholera (HC) antibody were inoculated with twelve field strains of HC virus isolated in Taiwan. Two pigs were used for each strain. The ALD strain was served as control. Two pigs inoculated with Tainan II strain died on day 24th and 26th PI. All of the pigs inoculated with the other strains died on day 12th to 18th PI. The pigs vaccinated with LPC strain virus were challenged with various field strains of HC virus. All of the pigs were free of clinical sign, but the pigs challenged with Yunlin strain showed fever sign. Only the rabbits inoculated with Tainan II strain virus showed febrile reaction. The rabbits died on day 6th after injected with Yunlin strain virus. Using the cell culture and fluorescent antibody techniques, the Yunlin strain virus was confirmed to be contaminated with pseudorabies virus. All of the field strain viruses propagated in primary swine testis cell culture showed the highest virus content in culture fluid on day 4th. The virus strains of ALD and Tainan III were $10^{6.0}$ and $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml respectively, and the others were $10^{2.0}$ - $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml.