

應用牛病毒性下痢症病毒控制 豬瘟之田間試驗

黃天祥 何維莊 賴秀穗 萬小坤 陳忠松

(臺灣省家畜衛生試驗所)

林再春 李崇道 (中國農村復興聯合委員會)

Sheffy, B. E. (美國康奈爾大學)

劉庚秋 (澎湖縣家畜疾病防治所)

摘 要

BVD 疫苗澎湖田間試驗，從1976年4月至同年12月以 BVD 疫苗共免疫三週齡仔豬 7,942頭，以 LPC 疫苗免疫頭數為 5,269頭在免疫期間免疫豬均無不良反應，亦無豬瘟病例發生。在田間試驗後第 10個月 (1977年2月) 每月開始由屠宰場收集 BVD 疫苗免疫之屠宰豬血清至同年7月共收集 696頭，經抗體測定結果 BVD 抗體之分佈差異甚大，244 頭 (35%) 無 BVD 抗體但中和抗體力價在256倍以上者有116頭 (16.6%)，至於屠宰場收集之豬血清，無豬瘟抗體者佔91.24% (635頭)，其餘61頭佔 8.76%含中和力價甚低之豬瘟抗體，其力價均在 8 倍以下，疑為與 BVD 抗體之交又非特异性反應。

BVD 免疫之田間試驗豬，10及17週齡者各 16頭經豬瘟毒攻毒後分別有 7 及 6 頭耐過佔 43.75及 37.5%。耐過豬均有典型豬瘟熱反應、毒血症、白少球減少症及排毒現象。

田間試驗前後，澎湖地區之牛隻 BVD 抗體分佈並無顯著差異。

緒 言

在國際合作豬瘟研究計畫中以牛病毒性下痢症病毒 (BVD) 免疫三週齡 SPF 小豬，非但無任何不良反應，而且對豬瘟強毒產生良好的免疫^{1,2}，BVD 病毒對仔豬之感染機序亦被證明³，該毒只能在豬之網狀內皮系統內繁殖，而無毒血症 (Viremia) 及排毒現象，此外由人工感染試驗亦證實 BVD 毒對本省牛隻之病原性弱⁴，綜上所得結果顯出 BVD 毒應用在本省豬瘟防疫之可行性甚高，但上述成績只是初步試驗結果，為進一步證明該毒對豬之安全及免疫效力，故做本田間試驗，本田間試驗選擇澎湖，因其為一離島，控制較易，並對試驗成績之觀察及評價較為容易。

材料與方法

1. 細胞：初代牛睪丸細胞之準備，以無菌操作技術將小公牛之睪丸取下，經去莢膜、剪碎胰蛋白酶消化及離心，最後以 MEM (GIBCO 出品) 培養液含 10% 胎牛血清 (無 BVD 抗體) 泡製成 0.5% 之細胞液，並以平玻璃瓶或試管靜置 37°C 恆溫箱培養成單層細胞供 BVD 病毒增殖及血清中和力價測定。豬初代睪丸細胞之準備方法，以無菌取下六週齡小豬睪丸後，其方法與準備牛初代睪丸細胞相似。

2. 病毒：BVD 病毒 (Tobias 株)：Tobias 株病毒由澳洲輸入，以牛睪丸細胞增殖後經凍結溶解二次後，低速離心去細胞碎片，以 20% Lactose 及 0.6% PVP 為媒劑與病毒液 1:1 混合經冷凍乾燥後病毒力價為每西西含 $4.5 \log \text{TCID}_{50}$ ，於 4°C 冰箱保存，供 BVD 抗原田間免疫豬用。另將病毒液小量分裝存於 -70°C 供中和抗體試驗。

豬瘟毒 (A76 株及 ALD 株)：豬瘟毒 A76 株係由日本引進供豬瘟中和抗體測定用。ALD 株係本所兔化疫苗效力試驗之強毒株，以豬隻繼代保存，其 PID_{50} 為 6.0 log

新城雞瘟病毒 (宮寺株)：本毒株亦由日本引進，供 END 法測定豬瘟中和抗體用。

豬瘟血毒症及排毒檢查方法：BVD 疫苗免疫豬攻擊 ALD 毒前後隔日採取血液及收集尿、糞後經遠心加抗生素處理後，接種於 PK-15 細胞三天後，以螢光體法染色證明豬瘟毒之存在。

BVD 中和抗體之測定：豬或牛之血清經 56°C 30 分非働化後，以 MEM 培養液 5 倍稀釋，每一稀釋階段加入等量含有 100 TCID_{50} 之 (Tobias 株) BVD 病毒液，置 37°C 1 小時後，分別吸取 0.2ml 之病毒血清混合液，接種於初代牛睪丸單層細胞，(每一稀釋階段用 3 支試管細胞) 後加入 1ml 之細胞保持液 (MEM 加 2% Fetal calf serum) 45 度傾斜靜置 37°C 4 天後判定細胞病變，其抗體力價以 Spearman-Kärber 法計算。

豬瘟中和抗體測定 END 法：豬隻血清經 56°C 30 分鐘非働化後，以 MEM 5 倍稀釋後，每一稀釋階段加入等量含有 100 TCID_{50} 之豬瘟病毒 (A76 株) 液，置 37°C 一小時後，每一稀釋階段取 0.1ml 加入 2 支試管，再加入 0.4ml 之初代豬睪丸細胞液，以橡皮塞緊塞試管 45 度傾斜靜置於 37°C 培養 4 天後，抽去液體，再加入含 2HA 之新城雞瘟病毒 (宮寺株) 液 1ml 攻擊，置於 37°C 暖室內之旋轉盤，培養 3 天後判定，有細胞病變則為無抗體，中和力價以 Spearman-Kärber 法計算。

免疫方式及區域劃分：將澎湖依自然地理分成三區；第一區包括 4 個鄉鎮 (馬公、湖西、白沙與西嶼)，本區所有三週齡小豬以 BVD 疫苗免疫一次，種豬則在配種前及每 10 個月免疫 LPC 一次。所有進入本區之豬必經過 2 週之檢疫，並注射 BVD 疫苗，每月預定由屠宰場收集經 BVD 免疫之豬血清 50 頭，其中 10 頭為母豬，40 頭為肉豬，供豬瘟及 BVD 抗體測定。

第二區為望安鄉：做為無 BVD 疫苗免疫之對照區，本區內之三週齡仔豬均以 LPC 疫苗免疫一次，種用豬則在配種前及每 10 個月再免疫 LPC 疫苗。

第三區為七美鄉：做為無免疫對照區，在本區之所有豬隻均不免疫 LPC 或 BVD 疫苗。

以上三區之牛隻在 BVD 抗原免疫試驗前及 10 個月後分別各採取 105 頭及 102 頭供做 BVD 抗體之分析。

BVD 抗原免疫豬攻豬瘟 ALD 強毒試驗：BVD 抗原免疫之 10 及 17 週齡豬各 16 頭運回淡水，每組 16 頭中各 8 頭以肌肉注射 ALD 強毒 1ml (10^1LD_{50})，其餘各 8 頭分別做為同居感染，臺糖之 6 週齡無兔化毒及 BVD 抗原免疫豬 12 頭做為對照組其中 8 頭以肌肉注射上述等量之 ALD 毒，其中 4 頭做為同居感染試驗。

結 果

一、三個試驗區免疫之豬隻頭數：BVD 疫苗在澎湖進行田間試驗，自 1976 年 4 月至 12 月以 BVD 抗原共免疫 3 週齡仔豬 7,942 頭，以 LPC 疫苗免疫頭數為 5,269 頭。(表一)。在免疫期間未發現有免疫後不良反應者，亦無臨床豬瘟病例發生。

表一 澎湖田間試驗 BVD 及 LPC 疫苗免疫豬頭數

(1976年4月至12月)

Area	County	Vaccine	April	May	June	July	August	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Total	
A	Makung 馬公	BVD	—	126	166	195	187	195	415	271	314	1869	
		LPC	—	557	270	366	193	260	415	257	86	2404	
	Fusi 湖西	BVD	—	—	82	109	152	152	203	165	139	2802	
		LPC	224	170	102	75	80	121	67	64	64	903	
	Siyu 西嶼	BVD	129	202	150	188	301	160	245	166	164	1576	
		LPC	—	145	99	87	53	12	119	35	115	665	
	Bisa 白沙	BVD	—	254	43	132	208	267	354	233	204	1695	
		LPC	—	496	100	269	63	75	113	54	27	1197	
	B	Wan-An 望安	BVD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			LPC	—	29	—	—	9	7	—	46	9	100
C	Chimei 七美	BVD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		LPC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Total		BVD										7942	
		LPC										5269	

二、BVD 抗原免疫之屠宰豬之豬瘟及 BVD 中和抗體調查：從1977年2月到同年7月，在第一區屠宰場共收集 BVD 免疫豬血清696頭（2月收集51頭、3月192頭、4月117頭、5月106頭、6月137頭、7月93頭）經抗體調查結果如圖1所示。針對 BVD 抗體測定結果，在696頭中，244頭無抗體佔35%，抗體力價在256倍以上者有116頭佔16.6%其餘336頭佔48.4%，則平均散佈在2到256倍之間，至於屠宰豬之豬瘟抗體測定結果，在696頭中635頭無抗體佔91.24%，中和抗體力價在2—4倍間有44頭佔6.32%，在4—8倍之間者有17頭佔2.44%。

三、BVD 抗原免疫豬以豬瘟 ALD 毒攻毒結果：如表2所示 BVD 抗原免疫後十週齡豬16頭中8頭以肌肉注射 ALD 強毒及8頭同居感染，結果呈典型豬瘟熱反應耐過者，分別為4及3頭佔43.75%，其餘均因典型豬瘟斃死，在十七週齡之 BVD 抗原免疫豬16頭中僅6頭呈典型豬瘟熱反應耐過佔37.5%，其餘均因豬瘟斃死。對照組12頭攻毒後全部因豬瘟而死。攻毒後病死豬均以解剖及腦之病理組織切片鑑定為豬瘟斃死。

BVD 抗原免疫豬經 ALD 毒攻毒後，不論耐過或斃死之豬均有典型之豬瘟熱反應（圖2），耐過豬在熱反應期間約1~3天出現豬瘟血毒症並由尿及糞便中排出豬瘟強毒，斃死豬之血毒症及排毒現象則一直間歇持續到死亡為止。

圖一 BVD 免疫屠宰猪之 BVD 及 HC 抗體分佈

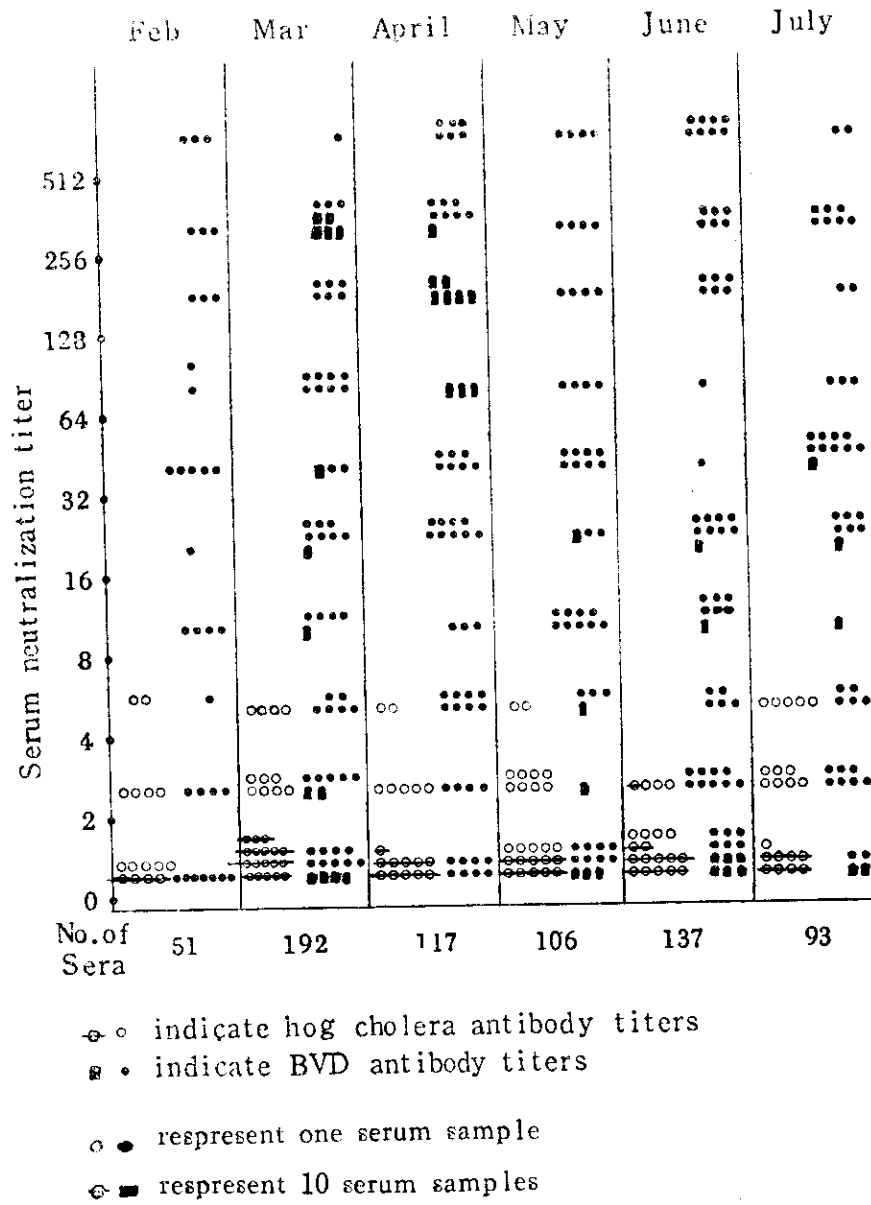
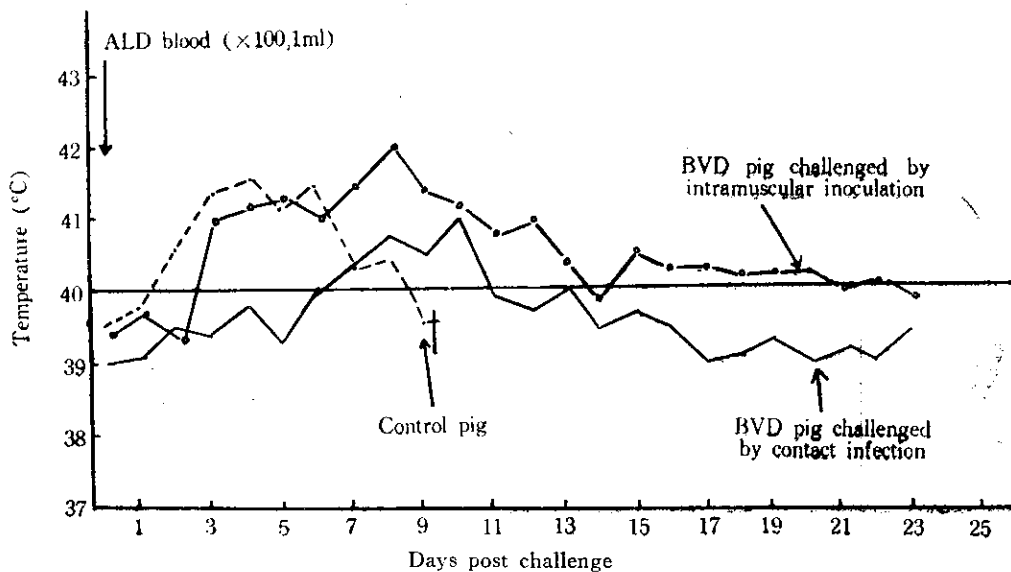


Figure 2 Rectal temperature of BVD antigen vaccinated pigs survived after challenge with virulent hog cholera virus ALD strain



- Geometric mean of antibody titer against :
- HCV of inoculated pigs (survived)
 - △——△ HCV of contact pigs (survived)
 - - -○ BVDV of inoculated pigs (survived)
 - △- - -△ BVDV of contact pigs (survived)
 - HCV of inoculated pigs (Dead)
 - ▲——▲ HCV of contact pigs (Dead)
 - - -● BVDV of inoculated pigs (Dead)
 - ▲- - -▲ BVDV of contact pigs (Dead)

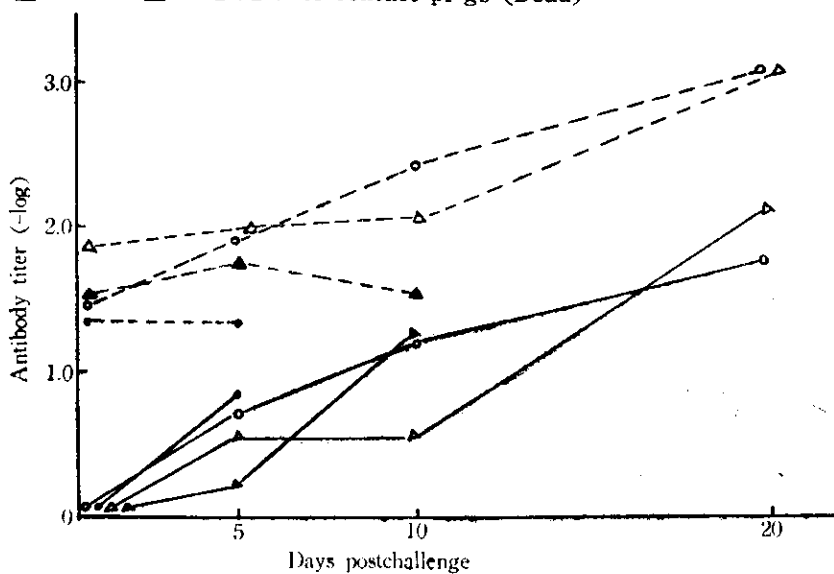


Figure 3 HC and BVD antibody response in BVD antigen vaccinated pigs at 10 weeks of age before and after challenge with virulent HCV

ALD strain

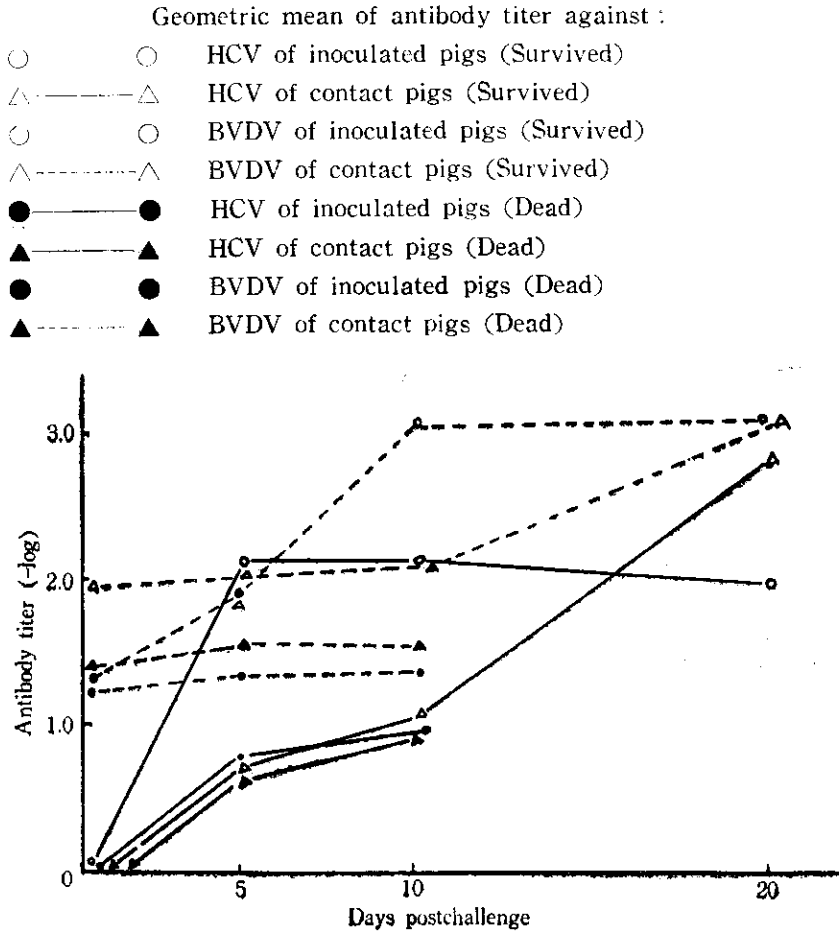


Figure 4 HC and BVD antibody response in BVD antigen vaccinated pigs at 17 weeks of age before and after challenge with virulent HCV ALD strain

表二 澎湖猪隻 BVD 接種之免疫效果

攻 毒	BVD 組		對 照 組
	10 週 齡	17 週 齡	6 週 齡
肌 肉 注 射	4/8	3/8	0/8
同 居 感 染	3/8	3/8	0/4
計	7/16 (43.75%)	6/16 (37.5%)	0/12

註：1.三週齡時接種 BVD 疫苗一劑量 ($10^{4.5}$ TCID₅₀)。

2.分母表示攻毒頭數分子表活存頭數。

3.攻毒係以 ALD 毒血 ($\times 100$, 1ml/頭)。

4.對照組由臺灣畜殖研究場購得。

攻毒前後 BVD 及豬瘟抗體產生情形如圖 3、4 所示，攻毒前之 BVD 抗體平均介於 1.0—2.0log 之間，攻毒前之 BVD 抗體力價與對豬瘟強毒之抵抗力無絕對關係，攻毒後耐過豬對 BVD 及豬瘟抗體產生較快，似有二次性刺激作用，斃死豬之抗體則在攻毒後略微上升或下降。對照組之兩種抗體在攻毒後均無法產生。

四、澎湖地區牛隻血清 BVD 抗體調查：

在 BVD 疫苗田間試驗前採集105頭黃牛血清經 BVD 抗體測定結果 102 頭無抗體佔97.14%，其餘 3 頭之抗體力價均在56倍以上佔2.86%。

在田間試驗一年後採集120頭黃牛血清經 BVD 抗體測定結果115頭無抗體佔 95.83%其餘 5 頭有 BVD 抗體其中 2 頭力價在56倍以上佔1.67%，3 頭則均為 2 倍佔2.50%。

討 論

BVD 疫苗田間試驗從1976年 4 月至1976年12月，在第一試驗區內，以 BVD 疫苗共免疫 3 週齡仔豬7,942頭，而以 LPC 疫苗免疫者有 5,169頭，第二區以 LPC 疫苗免疫100頭，第三區則為無免疫對照區，在田間測驗期間經 BVD 或 LPC 免疫後之仔豬均無不良反應，亦無臨床豬瘟病例發生。根據澎湖猪瘟疫情報告在田間試驗前，澎湖地區已有 3 年未曾有猪瘟病例之報告，因此在田間試驗期間雖無猪瘟病例發生，並非完全由於疫苗之防疫結果，故對 BVD 疫苗之真正效力，未能從臨床缺乏猪瘟病例來證明。

在田間試驗後第 10 個月 (1977年 2 月) 開始從屠宰場收集 BVD 疫苗免疫過之屠宰猪血清，在 6 個月期間共收集 696頭血清，經 BVD 抗體測定結果其中65% (452頭) 屠宰猪有 BVD 抗體力價在256倍以上者有16.6% (116頭)。無 BVD 抗體反應者佔35% (244頭) 由上結果得知 BVD 疫苗免疫仔猪隻產生抗體其消長速度差距甚大，換言之，BVD 疫苗注射猪後產生抗體情形，隨猪個體差異甚大。

在696頭血清中 635頭 (91.2%) 無猪瘟抗體，其餘61頭 (8.6%) 雖有猪瘟抗體之反應但力價甚低，均低於 8 倍。從大部分屠宰猪無猪瘟抗體之存在得知，在田間試驗期間並無強毒之感染，8.6% 之血清中含甚低之猪瘟抗體，可能由於少數之血清因含甚高之 BVD 抗體，而與猪瘟發生交叉中和之非特异性反應，並非由猪瘟毒產生。

由上述臨床觀察及屠宰猪之 BVD 及 HC 抗體之分析結果，無法證明 BVD 疫苗應用於田間之實際效果，因此任意購買 10 及17週齡之 BVD 免疫猪做為實驗室內攻擊猪瘟強毒之用。攻毒結果發

現約為41%之豬隻耐過豬瘟強毒之攻擊，耐過豬均呈典型之豬瘟熱反應，而且在熱反應期間發生豬瘟血毒症及白血球減少症，且由尿及糞便中間歇地排出豬瘟毒。由攻毒前 BVD 抗體力價得知三週齡仔豬注射 BVD 疫苗後，大部豬產生相當高之血清抗體，但抗體之高低與耐過豬瘟強毒之攻擊不成正比，換句話說抗體較高與較低者，攻毒後均有死亡或耐過發生，此因 BVD 抗原在豬內增殖時刺激 T 細胞而使活化並發生記憶，一旦豬瘟毒入侵時，那些帶有記憶之 T 細胞則很快被活化而產生保護作用，另一方面與 B 細胞合作製造血清中和抗體，攻毒耐過豬之 BVD 及 HC 抗體產生較快，顯然有二次性刺激現象發生。攻毒前後 BVD 及豬瘟抗體產生情形如圖 2、3 所示，攻毒前之 BVD 抗體平均介於 1.0—2.0 log 之間，攻毒前之 BVD 抗體力價與對豬瘟強毒之抵抗力無絕對關係，攻毒後耐過之豬對 BVD 及豬瘟之抗體產生較快，似有 2 次性刺激作用，斃死豬之 BVD 及豬瘟抗體則在攻毒後略微上升或下降。

牛隻血清之 BVD 抗體反應，在田間試驗前所採之 105 頭牛血清中，僅 3 頭有 BVD 抗體且在 56 倍以上，在田間試驗一年後，收集之牛血清抗體在 56 倍以上者在 120 頭中僅有 2 頭，2 倍者僅有 3 頭，前後並無顯著的差異，不因 BVD 疫苗之普通使用而污染牛羣。

綜上所得之結果，知 BVD 疫苗對 3 週齡仔豬之安全性甚高，由接觸之牛隻抗體分佈無顯著差異之情形，得知接種 BVD 疫苗之仔豬可能無排毒現象，雖然 BVD 疫苗對仔豬及牛隻極為安全，但對豬瘟之免疫效率不高約 40% 左右，本試驗結果與劉氏等報告之 BVD 疫苗對 SPF 豬之免疫性極高，尤其 Tobias Strain 將近 100% 耐過，此種不同可能因用來試驗之豬不同而異。本試驗中耐過豬均有典型豬瘟之熱反應，且有血毒症，白血球減少及排毒現象，故應用 BVD 疫苗來預防豬瘟應慎重考慮。

誌 謝

本研究之完成承蒙農復會之經費補助，作者感謝澎湖縣家畜疾病防治所及本所豬瘟股同仁之協助。

參 考 文 獻

1. 劉培柏、陳忠松，Sheffy, B. E.，林再春、李崇道 (1975)：牛病毒性下痢病毒與豬瘟抗體產生之關係，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告，12；1—12。
2. 劉培柏、陳守仕，林再春，Cheffy, B. E.，李崇道 (1975) 四種 BVD 病毒株對抗豬瘟之免疫效力，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告，12；13—20。
3. 劉培柏、黃天祥，Sheffy, B. E.，林再春 (1975) 牛病毒性下痢病毒對仔豬之病原性，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告，12；21—26。
4. 劉培柏、邱朝齊，Sheffy, B. E.，林再春、李崇道 (1975) 牛病毒性下痢病毒對本省乳牛及黃牛之病原性，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告。12；27—34。

Field Trial for Hog Cholera Eradication in Peng-Fu by Using Bovine Viral Diarrhea Antigen

Huang, T. S., Ho, W. C., Lai, S. S., Wan, S. K., Chen, C. S.
(Taiwan Provincial Research Institute For Animal Health)

Lin, T. C., Lee, R. T. C.
(Joint Commission for Rural Reconstruction)

B. E. Sheffy

Liu, K. C.
(Peng-Fu Animal Disease Control Central)

Summary

In Peng-Fu field test, 7,942 pigs were vaccinated with BVD vaccine and 5,269 pigs with LPC vaccine at 3 weeks of age from April to December of 1976. Neither clinical signs nor hog cholera case was found during the field trial. Ten months after the first vaccination in the field trial, 695 sera were collected at slaughter house monthly from BVD vaccinated pigs during the period of February and July of 1977. The distribution of BVD antibody among 695 sera varied greatly; 244 sera showed no antibody titer, while 116 sera had a titer higher than $\times 255$. Most of sera (91.24%) had no hog cholera antibody, but 61 sera (8.76%) showed low antibody response against HCV. Thirteen out of 32 BVD antigen vaccinated pigs at 10 or 17 weeks old survived after challenge with virulent HCV. All survived pigs had viremia, leucopenia and virus shedding in urine and feces during fever response. The level of BVD antibody titers in the pigs showed no important relationship with their resistance to HCV challenge. However, the production of antibody against both BVD and HC virus in survived pigs had an anamnestic response after challenge with HCV. There was no significant difference in BVD antibody distribution in Peng-Fu yellow cattle before and post field test.