

在巴拉圭應用兔化豬瘟毒液體疫苗之 保存性試驗

陳 清¹，Amanda Maria Samudio Mino²，Nelson Feliciano Aguirre²

1. 中華民國駐巴拉圭共和國農業技術團技師 2. 巴拉圭共和國農牧部獸醫師

摘 要

兔化豬瘟毒 LPC 株，接種感染兔之脾臟及淋巴腺等臟器所製成之液體疫苗，以26頭小豬及26隻家兔作病毒力價測定之結果，疫苗製成直後對豬隻之平均保護力價 (50% Protective dose) 為 $10^{4.5}$ PD₅₀/gm，冷存於 2—5°C 冰箱9個月，其力價下降為 $10^{2.22}$ PD₅₀/gm。另一方面，疫苗對家兔之發熱平均感染力價 (50% Rabbit infection dose) 為 10^6 RID₅₀/gm，但冷存至9個月時則下降至 $10^{3.5}$ RID₅₀/gm (詳如表1及表2)。

不同冷存期間之疫苗，接種於2~4隻家兔各一劑量 (2ml)，共使用21隻家兔 (包括對照用)，接種兔每日上、下午各測量體溫一次，期間為10天，均可產生典型特徵性之熱反應。體溫上升達41.1°C以上者，在16隻接種兔中佔14隻 (87.5%)，這種熱反應幾與僅接種1% LPC 株感染兔之脾臟及淋巴腺乳劑之熱型相同。疫苗冷存迄至9個月時，對家兔之特徵性型態之體溫曲線，尚未有顯著之影響 (請看表3)。

家兔接種後第2~3天體溫達到最高峰 41~41.8°C，迄至第四天則下降至正常體溫。然後於接種後第五~六天又出現體溫上升之現象 (40.1~41°C)。

呈現第二度體溫上升曲線，在16隻家兔中佔12隻 (75%陽性反應)，唯兩次之高峰體溫不盡相同，第一次出現者顯較第二次者為高。形成二波浪狀，因此吾等稱之為「二相式體溫曲線」(請看圖例)。

兔化豬瘟毒液體疫苗，於2~5°C 冰箱冷存一週，四週，與2、3、6及9個月後，分別以2~4頭小豬各接種一劑量 (2c.c) 作免疫效力試驗，共使用21頭小豬 (包括對照用)，疫苗注射後第10天，以豬瘟強毒 ALD 株毒血 10^3 MLD 攻毒，觀察三週，所有供試豬隻均獲得耐過健存。對照豬使用和試驗豬相同之毒血及濃度攻毒之結果，均呈現典型之豬瘟症狀於二週內斃死或試殺 (詳如表3)。

疫苗之 PH 值，於製成直後以東洋 PH 試驗紙 (Brom Cresol Green, B. C. G)，依浸漬法 (Soak method) 測定之結果 PH 值為5.4。疫苗冷存一週、四週與2、3、6及9個月後，其 PH 值並無顯著之改變。

緒 言

豬瘟係一急性熱性傳染病，其傳染迅速，症狀顯著，死亡率極高，對養豬事業威脅最大，影響農村經濟甚鉅，乃世界上最重要豬病之一。雖世界各國對於豬瘟防治之研究不遺餘力，然而由於病毒傳

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 13: 1— (1976)

註：本報告之西班牙文稿刊載於巴拉圭獸醫雜誌 "Veterinaria" No. 23. P.4~12 (1977)。

播迅速，豬隻繁殖亦快，且流動性頗大，因此對於本病之防治頗為困難。

至於豬瘟之預防工作，自 Dorset 以後，由臟器疫苗改為血液疫苗，復改為臟器及血液混合疫苗⁽¹⁾。迄至1947年 J. A. Baker 以本病毒通過家兔成功後，在豬瘟之防治工作上誠為一大轉變。目前雖也有其他變異弱毒之株如 GPE 組織培養疫苗之發展與應用^(5,6)。兔化豬瘟疫苗，其安全性大與免疫力強。筆者曾報導⁽⁷⁾ 活毒疫苗接種後三天，即可產生預防效果。因此目前仍有很多國家採用本疫苗供為豬瘟之防疫。

筆者及共同研究者⁽⁸⁾曾報告兔化豬瘟疫苗接種三天後之豬隻，即可抵抗豬瘟強毒 ALD 株毒血 10^5 MLD 之攻毒。林等^(2,9)報告，乾燥兔化豬瘟疫苗在 2—5°C 冰箱中可保存三年半以上，唯液體疫苗之保存性資料尚屬缺乏。在巴拉圭共和國為了實際應用上之需要，在尚未開始製造冷凍乾燥疫苗之前，其液體疫苗之使用，仍為解決當今之急。因此液體疫苗之保存性如何？確有加以研討之必要，以利豬瘟之防治。

試驗材料與方法

(一) 試驗材料

1. 供試毒株：

- 1) 兔化豬瘟毒 LPC 株：於1975年6月筆者(陳)自我國臺灣省家畜衛生試驗所分讓攜來巴拉圭作為兔化豬瘟疫苗製造之用。
- 2) 豬瘟強毒 ALD 株：於同年由同一試驗所攜來巴拉圭作為豬瘟之研究及疫苗效力檢定之用。

2. 供試兔化豬瘟疫苗：

係由前述兔化豬瘟毒 LPC 株，經通過巴拉圭國產家兔七代毒，感染兔之脾臟及淋巴腺為材料，以生理食鹽水為稀釋液所製成之液體疫苗，每 C.C 中含有200國際單位之青黴素及0.5公絲之鏈黴素。

3. PH 測定紙：

使用東洋 PH 試驗紙 ("Toys., PH test paper) Brom Cresol Green (B. C. G)，以測定疫苗製成直後及使用直前之 PH 值。

4. 供試動物：

- 1) 家兔：係由 San Lorenzo 附近農家收購之家兔供用，體重在 2~2.5 公斤左右，毛色品種不拘。
- 2) 小豬：係由 San Lorenzo 附近養豬場購得 7~9 週齡，未經任何豬瘟疫苗預防注射之小豬。

(二) 試驗方法：

1. 疫苗之力價測定：

兔化豬瘟毒液體疫苗製成直後，其 10^{-4} ~ 10^{-6} 之稀釋疫苗，及冷存於 2~5°C 冰箱9個月後，其 10^{-2} ~ 10^{-5} 之稀釋疫苗，每一稀釋階段分別接種 2~4 頭試驗動物，其使用26頭小豬及26隻家兔(包括對照羣)以測定疫苗所含之病毒力價。

2. 家兔之熱反應試驗：

由 LPC 株感染兔臟器所製成之液體疫苗，冷存於 2~5°C 冰箱，經一星期、四星期與 2、3、6 及 9 個月後，各任意抽取疫苗二瓶，混合後經離心分離，(1000 RPM 5~10分鐘)，然後抽採上清液分別接種於家兔耳靜脈 2~4 隻，其使用21隻(包括對照羣)，每日測量體溫二次，經10天後再以 LPC 株感染兔之脾臟100倍乳劑 1ml 靜脈注射攻毒，每日仍

測量體溫二次，觀察二星期，以測定疫苗接種後及攻毒後家兔熱型之變化。

3. 小豬之免疫性試驗：

前述不同期間冷存後之液體疫苗，除各接種於家兔 2~4 隻外，另各皮下接種於試驗小豬 2~4 頭，共使用 21 頭小豬（包括對照羣）同樣經 10 天後再以 10^5 MLD 豬瘟強毒 ALD 株毒血攻毒，觀察三星期，以測定其免疫性。

4. 疫苗 PH 值之測定：

疫苗製成直後及各不同保存期間後於使用直前，其 PH 值以東洋 PH 試驗紙依浸漬法（Soak method）加以測定。

試驗成績

（一）疫苗力價之測定結果：

以 26 頭小豬及 26 隻家兔供為疫苗製成直後，及冷存於 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱 9 個月後之力價測定結果。得知疫苗製成直後，以小豬測定之成績為 $10^{4.5}$ P D₅₀/gm，唯冷存 9 個月後再測定之結果，其力價僅有 $10^{3.25}$ P D₅₀/gm。另一方面，家兔接種 10^{-6} 稀釋之疫苗，尚可產生典型之熱反應，但冷存 9 個月後，其力價下降至 10^{-3} 。（詳如表 1 及 2）。

（二）疫苗接種兔之熱型及其熱反應

不同冷存期間之疫苗，接種於 2~4 隻家兔各一劑量（2ml），接種兔每日上、下午各測量體溫一次，期間為 10 天，均尚可產生典型特徵性之熱反應。而體溫上升 41.1°C 以上者，在 16 隻接種兔中佔 14 隻（87.5%），這種熱反應幾與僅接種 1% LPC 株感染兔之脾臟及淋巴腺乳劑之熱型相同，疫苗冷存迄至 9 個月時，對接種兔特徵型態之體溫曲線，尚未有顯著之影響（請看表 3）。又由圖例 1 得知家兔接種後第 2~3 天體溫上升達到最高峯的 $41\sim 41.8^{\circ}\text{C}$ ，迄至第 4 天則下降至正常體溫，然後於第 5~6 天又出現體溫上升之現象（ $40.1\sim 41^{\circ}\text{C}$ ）。呈現第二度體溫上升曲線，在 16 隻家兔中有 12 隻（佔 75%）。惟兩次之高峯體溫不盡相同，第一次出現者，顯較第二次者為高，形成二波浪狀，因此吾等稱之為「二相式體溫曲線」（Diphasic temperature curve）。

（三）疫苗對於試驗豬之免疫性

兔化豬瘟毒 LPC 株感染兔臟器所製成之液體疫苗，於製成直後免疫有效力價可達 $10^{4.5}$ P D₅₀/gm，已如前述。至於冷存於 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 電冰箱一星期、四星期與 2、3、6 及 9 個月後，分別以一劑量（2ml）皮下接種於未經任何豬瘟疫苗預防注射之小豬，各 2~4 頭，共使用 21 頭小豬（包括對照羣），經 10 天後再以豬瘟強毒 ALD 株 10^5 MLD 毒血攻毒，經觀察三星期之結果，所有供試豬隻均獲得耐過健存，而對照豬則呈現典型豬瘟症狀，分別於攻毒後第 10、12 及 13 天斃死或試殺。詳如表 3，由該表得知，液體疫苗冷存於 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 個月者，其一劑量對於試驗小豬尚可獲得良好之免疫效果。

（四）疫苗之 PH 值

由感染兔之臟器，以未修正 0.85% 生理食鹽水製成之疫苗（200 倍乳劑），於疫苗製成直後以東洋 PH 試驗紙，依浸漬法測定其 PH 值為 5.4。經冷存於 $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱一星期，四星期與 2、3、6 及 9 個月者，於使用直前再以相同方法分別測定之結果，未發現因冷存時間之延長而有所改變。

討 論

兔化豬瘟疫苗免疫豬，對各株豬瘟病毒之攻毒均能耐過，且甚穩定，因此在我國使用已有二十年

之歷史。東南亞國家和地區，如馬來西亞、越南、新加坡、香港等亦相繼向我國採購應用。在南美洲的巴拉圭自1975年由我國引進該項種毒試製疫苗以來，現已普遍使用。至於兔化豬瘟毒 LPC 株，據鄭森淵及林再春等(1)報告，含毒臟腑及淋巴腺於 11~17°C 室溫下可能保存三日，如在 2~5°C 冰箱內至少能保存33日。然而含毒臟器製成之液體疫苗，於冰箱內 (2~5°C) 究可保存多久，尚未有所報告，由於目前在巴拉圭尚未開始製造冷凍乾燥兔化豬瘟疫苗，而為了配合特殊環境之需要，因此液體疫苗之保存性確有加以研討之必要。在本試驗項目中，吾等除對保存性之長短與免疫效力之關係，對家兔之熱型及熱反應加以研討外，同時對於疫苗之 PH 值亦一併加以探討。

由試驗結果得知，疫苗製成直後以 10^{-6} 稀釋乳劑 1ml 接種於家兔耳靜脈，尚可使之產生典型之熱反應，至於接種較高稀釋度之疫苗，是否仍會產生典型之熱反應，因未作試驗，無法確定，容後加以補試。關於感染兔之臟器，以 0.85% 生理食鹽水 (未修正) 調製之液體疫苗，無論是製成直後或各不同冷存期間後於使用直前，其 PH 值均為 5.4，其 PH 值並未發現有顯著之改變，因此似對病毒之生存影響不大。至於冷存 9 個月以上者是否仍可產生免疫效力，及對家兔是否仍可產生典型之熱反應，雖未加以探討，惟由病毒力價測定之結果，如表 1 及表 2 所示疫苗冷存 9 個月者，對於試驗豬及家兔力價已顯著下降。因此冷存 9 個月以上者，未再加以測定。在效力試驗方面，液體疫苗冷存至 9 個月者，雖尚可產生免疫效果，惟實際應用上當以盡早使用為宜，目前在巴國暫定製成後二週內用完。

疫苗冷存 9 個月，對於家兔尚可使之產生特徵性熱型，顯示該疫苗並未因冷存時間之延長而有所影響，仍含有相當之抗原，在各不同冷存期間供試疫苗接種兔 16 隻中 12 隻 (75%) 呈現二相式體溫曲線或稱二波浪式熱型，而此種特徵性熱型，其前浪顯較後浪為大，由試驗得知，如以 100~10,000 倍感染兔脾及淋巴腺乳劑接種家兔，於第 2~3 天體溫達最高峰，然後於第 4 天下降幾達平溫。而於第 5~6 天再出現二度性熱候，於第 7~8 天又達於平溫，嗣後即不再出現體溫上昇現象。惟如接種高於前述稀釋倍數或低濃度乳劑，如本試驗之冷存 9 個月疫苗者其二波浪狀體溫曲線之產生顯較為延後。此等特徵性熱型現象之發現，似因病毒之增殖與抗體之產生互為消長有關，且與鄭、林二氏報告本病毒接種兔於 2~8 日之間感染兔臟器 (脾及淋巴腺等) 製成之疫苗，有預防豬瘟之免疫效力，而第 11 日後接種兔之臟器製成之疫苗，則無防禦能力，頗合邏輯。

關於兔化豬瘟毒，雖已有林再春及賴秀穗等(4)報告可應用螢光抗體一組織培養二段法加以檢出及定量。惟目前尚未被用為代替豬隻作為檢定之依據。為節省材料經費起見，改用家兔代替豬隻作為檢定材料，由測定其熱反應及熱型，作為兔化豬瘟疫苗之檢定，頗有研究應用之價值。

誌 謝

本試驗之完成，承蒙巴拉圭農牧部長 Ing. Agro. Hernando Bertonni，我國駐巴大使胡忻將軍及巴拉圭國立亞松森大學獸醫學院院長 Prof. Dr. Eduardo Ruiz Almada 之鼓勵。兔化豬瘟毒 LPC 株及豬瘟強毒 ALD 株承蒙臺灣省家畜衛生試驗所陳所長守仕之允許分讓。經費承蒙本團劉團長錫禎及張技師定偉之協助。於此併誌萬分之謝忱。

參考文獻

- (1) 鄭森淵及林再春 (1958)：兔化豬瘟毒試驗報告，臺灣省政府農林廳獸疫血清製造所研究報告 No. 2 P. 3~9.
- (2) 林再春、楊子儒、周懋森、張茂林 (1963)：兔化豬瘟毒冷凍乾燥之研究 (I) 臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1 P. 1~27.
- (3) 林再春、楊子儒、周懋森、林仁志、陳森雄 (1963)：兔化豬瘟疫苗冷凍乾燥之研究 (II)，

臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1, P. 28~39.

- (4) 林再春及賴秀穗 (1970) : 兔化猪瘟毒之試管內 (In Vitro) 檢出及定量法之研究, 臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 7, P. 1~12.
- (5) 越智勇一 (1973) : 家畜傳染病, 第二版, 南江堂, 東京, P. 151~160.
- (6) 北里研究所編 (1974) : 動物のワクチン, 養賢堂, 東京, P. 81~89.
- (7) Chen Ching (1977) : La Peste Porcine (Cólera del cerdo) y su forma de prevenir. Revista Veterinaria No. 21. Asunción-Paraguay. P. 22~26.
- (8) Chen Ching ; Samudio Mino, Amanda Maria ; Aguirre, Nelson Feliciano. (1977) : Estudio Sobre los Controles de Inocuidad y Eficacia de las Vacunas Lapinizada y Cristal Violeta Usada en el Paraguay, Revista Veterinaria No. 22. Asuncion-Paraguay. P. 13~19.

Table 1. Virus Titration of the Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine in Pigs

Vaccine dilution		Duration of storage				
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Vaccine	Immediately after preparation			○ ○	○ ● ₁₄	● ₁₃ ● ₁₈
	Preserved in refrigerator at 2-5°C. for 9 months.	○ ○ ○ ○	○ ● ₁₁ ● ₁₂ ● ₁₃	● ₁₃ ● ₁₄	● ₁₃ ● ₁₅	
	Control		● ₁₂ ● ₁₃			

Remarks :

○ : Showed no reaction after vaccination and challenge.

●₁₁₋₂₀ : Died of Hog Cholera, the number represents death days after challenge.

Table 2. Fever Reaction of the Rabbits Inoculated with Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine.

Vaccine dilution		Duration of storage					
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Vaccine	Immediately after preparation	Inoculation			### ###	### ###	### ###
		*Challenge			— —	— —	— + +
	Preserved in refrigerator at 2-5°C. for 9 months.	Inoculation	### ## +	### ###	++ ++	— —	
		*Challenge	— —	— —	## ○	++ ++	
Control			## ##				

Remarks :

- ### : The rabbit temperature peaked up to 41.6°C. or higher post-inoculation and challenge.
- ## : The rabbit temperature peaked between 41.1°C. -41.5°C.
- ++ : The rabbit temperature peaked between 40.6°C. -41°C.
- + : The rabbit temperature peaked between 40.1°C. -40.5°C.
- : Normal temperature of the rabbit.
- : Died during experimental period.
- * : Rabbits were challenged at 10 days post-inoculation with 1 ml. of x100 spleen emulsion of rabbit infected with LPC strain.

Table 3. Effect of Preservation on the Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine in Rabbits and Pigs

Animal used.	Treatment	Duration of the vaccine Preserved in refrigerator. (2-5°C)						Control
		1 week	4 weeks	2 months	3 months	6 months	9 months	
Rabbit	Inoculation	###	###	###	###	######	######	#########
	Challenge	---	---	-+	---	+++	---	
Pig	Inoculation	○○	○○	○○	○○	○○○○	○○○○	● ₁₀ ● ₁₂ ● ₁₃ ● ₁₃ ⊗ ₁₀
	Challenge	○○	○○	○○	○○	○○○○	○○○○	

Remarks :

- ### : The rabbit temperature peaked up to 41.6°C. or higher, post-inoculation or challenge.
- ## : The rabbit temperature peaked between 41.1°C. -41.5°C.
- ++ : The rabbit temperature peaked between 40.6°C.-41°C.
- + : The rabbit temperature peaked between 40.1°C. -40.5°C.
- : Normal temperature of the rabbit.
- ₁₀₋₁₃ : Died of Hog Cholera, the number represents death days after challenge.
- ⊗₁₀ : Killed when moribund, number represents days after challenge.
- : Showed no reaction after inoculation or challenge with 10⁷ MLD of the ALD strain virulent blood.

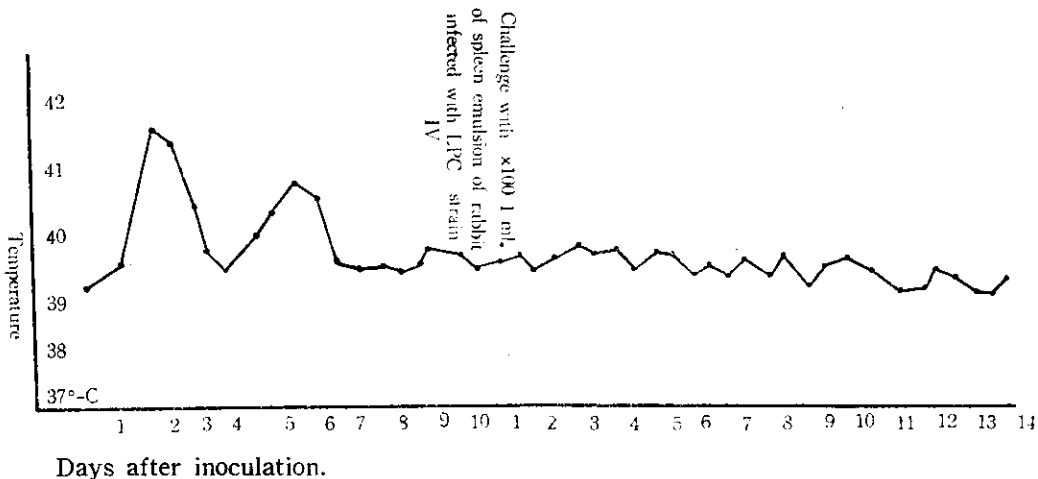


Figure 1 : Representative Fever Reaction of the Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine in Rabbits.

Studies on the Keeping Qualities of the Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine Used in Paraguay

Ching Chen ⁽¹⁾ ; Amanda Maria Samudio Mino ⁽²⁾ ;
Nelson Feliciano Aguirre ⁽²⁾ .

Summary

Attempts were made to study the stabilization of the Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine. The results were summarized as follow :

Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine was produced from spleens and lymph nodes of rabbits infected with LPC strain of hog cholera virus. The fresh prepared vaccine had a 50% protective dose of $10^{4.5}$ PD₅₀/gm when titrated in pigs, where as the vaccine after nine-month preservation in refrigerator at 2-5°C. had only a level of $10^{2.22}$ PD₅₀/gm.

(table 1)

Rabbits inoculated with 10^{-6} dilution of fresh vaccine still showed a typical curve of fever reaction. The virus titer of the vaccine dropped to $10^{3.5}$ RID₅₀/gm. after an interval of nine months when titrated in rabbits. (table 2)

Two to four rabbits were intravenously inoculated with 2 ml. of vaccines at various duration of preservation, respectively. Temperature of each rabbit was checked twice a day, in the morning and afternoon, for ten days. Typical fever reaction (temperature rise up to 41.1°C. or higher) were observed in 14 out of 16 rabbits (87.5%). The temperature curve was almost the same as that of control group. (table 3)

This typical curve of fever reaction caused by vaccine inoculation was not influenced by duration of vaccine preservation. The temperature rose to peak (41-41.8°C.) on the 2nd or 3rd day, then declined to normal range on the 4th day after inoculation. A second fever (40.1-41°C) was observed at 5 or 6 days after the inoculation. The first peak of fever was higher than the second. This phenomenon was called "diphasic temperature curve" Twelve out of 16 rabbits showed this reaction. (Figure 1)

The Lapinized Hog Cholera Liquid Vaccine preserved in refrigerator (2-5°C.) were tested for potency at various durations, i, e, from one week to nine months. All inoculated and control pigs were challenged with the virulent blood (ALD strain) at dose of 10^5 MLD on the 10 th day post-inoculation. All pigs were observed for clinical signs for 3 weeks. All the vaccinated ones survived, whereas the controls died of the challenge. (see table 3) .

The PH of the fresh prepared vaccine was 5.4. No any PH change was noted during various times of the nine months preservation.

Remarks :

- (1) . Doctor Veterinary Medicine, member of the Agricultural Technical Mission of the Republic of China to the Republic of Paraguay.
- (2) . Doctor Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture and Livestock of the Republic of Paraguay.