

28 - >

## 牛傳染性鼻氣管炎、牛病毒性下痢與牛副流行性感冒第三型混合不活化疫苗之開發

廖永剛\* 呂榮修 邱仕炎 李永林 林德田  
林地發 鄺懋勁 蔡向榮

台灣省家畜衛生試驗所

以胎牛睪丸細胞、胎牛肌肉細胞、胎牛腎臟細胞、胎牛鼻粘膜細胞及MDBK株化細胞來增殖培養牛病毒性下痢病毒(BVDV)。結果發現以在胎牛鼻粘膜細胞上培養可得最高之力價。以2種不活化劑0.2% V/V馬林或0.1M乙胺衍生物(BEI)及2種佐劑10%磷酸鋁膠或20%葡聚糖(DEAE-Dextran)，製成4種包括牛傳染性鼻氣管炎病毒(IBRV)、牛副流行性感冒第三型病毒(PI-3V)及BVDV的混合不活化疫苗。疫苗內的抗原含量在不活化及添加佐劑前為每ml含 $10^{7.0}$  TCID IBRV,  $10^{5.5}$  TCID BVDV及PI-3V。試製疫苗1劑量(5ml)接種於6月齡小公牛後間隔4週再補強1劑量可獲得良好免疫反應，IBR中和抗體可達1:4~1:256，BVD中和抗體可達1:64~1:4096，PI-3之血球凝集抑制抗體可達1:32~1:128。四種疫苗中IBR的免疫效果以福馬林不活化之DEAE-Dextran佐劑疫苗最佳，BVD的免疫效果以福馬林不活化的磷酸鋁膠佐劑疫苗最佳，PI-3之反應則以福馬林不活化的磷酸鋁膠佐劑疫苗最差( $P < 0.05$ )，四種疫苗在接種牛隻和小白鼠後並未引起任何不良反應，顯示其安全性甚佳。

**Key words:** IBR, BVD, PI-3, Vaccines

牛傳染性鼻氣管炎(Infectious Bovine Rhinotracheitis; IBR)為一病性劇烈之急性傳染病，病牛以高熱，分泌漿液性或化膿性之鼻漏、咳嗽、結膜炎、精神萎靡、乳量急減，孕畜流產為主徵，新生乳牛死亡率尤高。牛病毒性下痢(BVD)係有肺炎、下痢、異常產及粘膜病等多樣病症之疾病，而妊娠牛被感染時依

懷孕月齡不同，初期會引起免疫寬容(Immunological tolerance)，中期會引起異常產或畸形，後期感染則可正常生產[7]，但在防疫上最成問題者，乃在免疫寬容所生的小牛見似正常，但在血中持續排泄病毒成為感染源，且對二次感染喪失抵抗力，常合併感染*Pasteurella haemolytica*而引起肺炎。免疫寬容由Cyto-

\* 抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌,18(1):47-52.,1992  
台灣省家畜衛生試驗所

pathic Effect (CPE)(-)BVD病毒所引起，如生後再由CPE(+)BVD重覆感染時會引起粘膜炎[7, 16]，牛副流行性感胃三型(PI-3)係牛常見之呼吸道病原，常與其他病毒或細菌混合感染，或在牛隻受到緊迫，使發生所謂“輸送熱”之類的急性上呼吸道疾病[16]。

台灣在1967年Otte [13]已報告台灣牛隻有BVD及PI-3之抗體存在，並且由臨床以及疫情觀察認為有IBR存在。至1974年林等[1]調查本省牛隻發現7.1%有IBR抗體，71.4%有PI-3抗體。鍾等[6]在1977年報告本省牛隻28.2%有IBR抗體，84.3%有PI-3抗體，38.4%有BVD抗體。筆者等[3]在1988年調查發現本省牛隻59.1%有BVD抗體，50.9%有PI-3抗體。可見此三種疾病台灣之污染情形日益嚴重，而值得重視。尤其在1986-87年，台灣更發生IBR之大流行而造成農民之重大損失[4]。為加強對本省牛隻的防疫與控制，筆者等曾研開發IBR不活化疫苗於田間大規模應用，獲得令人滿意之結果[5]。筆者等更進一步開發IBR、BVD及PI-3三價混合不活化疫苗，俾能以經濟有效的疫苗來控制此三種牛隻常見之病毒性疾病，茲將有關試驗成績報告如下：

## 材料與方法

**疫苗毒株。** IBR係使用1986年於台灣分離之大社株[4, 5]，BVD及PI-3係由美國Fort Dodge Lab所分讓之毒株。

**供試細胞。** 本次研究所採用的細胞分別有初代之胎牛睪丸細胞(BT)，胎牛肌肉細胞(BM)，胎牛腎臟細胞，胎牛鼻粘膜細胞(BNM)，MDBK株化細胞等供為病毒增殖研究用。初代胎牛臟器細胞是以0.25% Trypsin(GIBCO)先將組織細胞消化，再以含8%胎牛血清之Eagle MEM(PH:7.2)培養液在37°C恒溫箱中培養增殖至形成單層細胞而供病毒增殖研究用。

**牛病毒性下痢病毒(BVDV)在不同培養細胞之增殖。** 以0.1MOI病毒量接種培養細胞，在37°C恒溫箱培養並觀察有無CPE形成，而在CPE形

成達80%時收集病毒液以2500rpm遠心20分鐘，去除沉積，取病毒液測試病毒力價藉以了解BVDV在各種細胞增殖情形並加以比較，以選出最合適BVDV增殖的培養細胞。

**牛傳染性鼻氣管炎病毒(IBRV)及牛副流行性感胃第三型病毒(PI-3V)之增殖。** IBRV及PI-3V之增殖方法與BVDV相同，但IBRV係以MDBK細胞增殖，PI-3V係以BT細胞增殖。

**不活化疫苗之製備。** 依上述之方法以MDBK細胞增殖IBRV，以BT增殖PI-3V，及以BNM增殖BVDV。各細胞分別以含8%胎牛血清之MEM在迴轉培養瓶中形成單層培養細胞，再以0.1MOI病毒接種至細胞上，在37°C迴轉培養增殖，待CPE形成80%時，收集病毒液並以2500rpm遠心20分鐘，收集病毒上清液。依Inaba [10]和鍾[6]等之方法添加0.2%福馬林或0.1M BEI(Bromo-Ethylene-Imine)不活化劑，經感作不活化完全後，並經雜菌檢定和不活化測試後，添加10%磷酸鋁膠(AlPO<sub>4</sub> Gel)或20% DEAE-Dextran為佐劑，經均質化，分裝送入冷藏庫保存備用。

**疫苗安全試驗及效力試驗。** 將初製成的三價混合不活化疫苗，分別對11頭6月齡小公牛(無IBR中和抗體)進行肌肉接種5ml，另以2頭為對照，經觀察4週再予補強肌肉接種5mL，於補強後2週為觀察期，並於上述安全試驗之小牛於試驗接種前及補強前和補強後2週採集血清測定IBR、BVD中和抗體力價和PI-3 HI抗體力價以了解牛隻接種疫苗後的抗體產生情形。

**抗體測定方法及分析。** IBR及BVD中和抗體之測定係以前述之方法[1, 3, 5]實施微量血清中和試驗，PI-3之HI抗體測定係依前述之方法[1, 3]實施微量血球凝集抑制試驗。所得抗體成績以pooled T Test比較各疫苗間的抗體反應有否差異，顯著差異標準(level of significance)為0.05(one tailed test)。

## 結 果

表 1 實驗牛接種試製疫苗之免疫效應比較\*

疫苗種類	牛隻數目	IBR(SN)**				BVD(SN)**				P1-3(HI)**									
		免疫前	免疫後 4週	補強後 4週	免疫前	免疫後 4週	補強後 4週	免疫前	免疫後 4週	補強後 4週	免疫前	免疫後 4週	補強後 4週						
BEI不活化磷酸鋁膠	2	<2	<2	96±45(ab)***	24±13.9(a)	96±55.4(b)	853.3±295.6(ab)	8±0	32±27.7(a)	128±0(a)	<2	<2	96±45(ab)***	24±13.9(a)	96±55.4(b)	853.3±295.6(ab)	8±0	32±27.7(a)	128±0(a)
BEI不活化	2	<2	<2	96±45(ab)	13.3±4.6(a)	42.7±18.5(b)	192±110.9(bc)	<8	26.7±9.2(a)	128±0(a)	<2	<2	96±45(ab)	13.3±4.6(a)	42.7±18.5(b)	192±110.9(bc)	<8	26.7±9.2(a)	128±0(a)
DEAE-Dextran	2	<2	<2	170±73.9(a)	3.3±1.2(a)	192±110.9(b)	704±554.3(ab)	<8	26.7±9.2(a)	128±0(a)	<2	<2	170±73.9(a)	3.3±1.2(a)	192±110.9(b)	704±554.3(ab)	<8	26.7±9.2(a)	128±0(a)
Formalin不活化	5	<2	<2	39.2±50(bc)	13.3±9.1(a)	768±280.4(a)	1792±885.1(a)	<8	22.7±10.6(a)	48±17.5(b)	<2	<2	39.2±50(bc)	13.3±9.1(a)	768±280.4(a)	1792±885.1(a)	<8	22.7±10.6(a)	48±17.5(b)
DEAE-Dextran	2	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8
Formalin不活化磷酸鋁膠	2	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8
對照組	2	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8	<2	<2	2±0(c)	8±0(a)	8±0(c)	8±0(c)	<8	<8	<8

\* 免疫後第4週，再以一劑量補強注射

\*\* 抗體力價以能抑制CPE形成(中和試驗)或抑制血球凝集(HI試驗)之最高血清稀釋倍數表示之；平均力價±標準差。

\*\*\* 同一行之括號內不同字母表示有顯著差異(P<0.05)SN=中和試驗，HI=血球凝集抑制試驗。

病毒在各種細胞之增殖。BVD病毒在BM及MDBK細胞繼代皆未有CPE之形成，在胎牛腎臟細胞則達到 $10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL之力價，在胎牛睪丸細胞(BT)有 $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL力價，在胎牛鼻黏膜細胞(BNM)則有 $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL之力價。而IBR病毒在MDBK細胞上可達 $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL，PI-3病毒在BT細胞上有 $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

不活化疫苗之製備，以0.2%福馬林或0.1M BEI都可將三種病毒不活化。

疫苗安全試驗及效力試驗，疫苗接種後牛隻無任何異狀或不良反應，顯示本劑之安全性極高而在效力試驗上也顯示本劑確實可刺激牛隻產生免疫反應，如表1。而所選用之不活化劑和佐劑，在本次試驗接種後並未有明顯之差別。試驗結果顯示，本劑接種後的IBR中和抗體，在補強前並未提升，在經補強後始可提升。

## 討 論

以BEI和Formalin兩種不活化劑及磷酸鋁膠或DEAE-Dextran兩種佐劑所調製之4種IBR，BVD及PI-3混合不活化疫苗在接種牛隻2劑量後皆可獲得良好之抗體反應，而4種不同配方之疫苗效果並無顯著差異。惟因試驗牛隻頭數少，可能需進一步在田間實施大規模試驗比較四組疫苗之優劣，以供為成品化之依據。其中IBR的中和抗體在第一次接種後並無上升，而直到補強後才有抗體上升的現象，此是否與抗原劑量有關尚待進一步探討。

由於IBR，BVD及PI-3在本省的普遍存在[1, 3, 4, 6]，本省目前尚無SPF牛隻可供使用，因此在本試製混合疫苗之試驗係挑選IBR抗體陰性牛隻來進行，這些牛隻在測試後發現在免疫前即有不等抗體力價的BVD及PI-3抗體，此與BVD與PI-3普遍存在於本省牛羣有關[1, 3, 6, 13]，雖然在試製疫苗接種後皆能有抗體上升的現象，其抗體反應與疫苗接種前所存在之抗體量的關係則須進一步檢討，惟此種情形可能更符合田間的實際抗體分布情形及疫苗使用

後效果。

BVD病毒在不同細胞培養系統上並不一定可造成細胞病變(CPE)，據文獻報告BVD病毒可在牛由來之胚胎牛腎細胞、胎牛皮膚-肌肉細胞，牛肺細胞，胎牛子宮內膜細胞，巨噬細胞及牛氣管器官培養[16]，胎牛骨髓細胞[14]，胎牛睪丸細胞[9]培養增殖，近年來一般研究者則多使用牛鼻甲骨(Bovine turbinate)細胞來分離或增殖BVD病毒[8, 12, 17]，在美國細胞中心(American Type Culture Collection)亦有牛鼻甲骨株化細胞之保存與供應。在本試驗中曾以胎牛肌肉細胞，胎牛腎臟細胞，胎牛睪丸細胞及MDBK株化細胞來增殖培養BVD病毒，但除在胎牛睪丸細胞可達 $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL之力價外或無CPE產生或力價很低，故亦曾準備初代牛鼻甲骨細胞來增殖BVD病毒，但是鼻甲骨細胞不能繼代增殖在使用上很不經濟及不方便，因而嘗試使用初代牛鼻黏膜細胞，結果發現BVD病毒在此細胞可達 $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL之高力價，並且牛鼻黏膜細胞至少可繼代十代以上，使用上十分方便，以牛鼻黏膜細胞來增殖培養BVD病毒似乎尚未見有文獻報告，其對其他BVD病毒株的增殖情形值得進一步加以檢討。

## 參考文獻

1. 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 14：56-72，1974。
2. 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 12：61-68，1975。
3. 呂榮修、廖永剛、林德田、鄭明珠、鄺懋勁、林地發、李永林、黃士則、李全：本省乳牛病毒性疾病之疫學調查，七十八年度台灣省農林廳畜產試驗評議會獸醫組第6題，1988。
4. 呂榮修、鄺懋勁、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。
5. 呂榮修、李永林、邱仕炎、廖永剛、鄭懋勁、林地發、蔡向榮：牛傳染性鼻氣管炎不活化疫苗之研製與應用, 中華獸醫誌投稿中, 1992。
  6. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峯、曾正文：豬假性狂犬病不活化疫苗佐劑之改進研究, 台灣省畜衛試研報 22: 81-88, 1986。
  7. Baker J C: Bovine viral diarrhea virus: A review. JAVMA 190: 1449-1458, 1987.
  8. Bolin S R, Littledike E T, Ridpath J F: Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. Am J Vet Res. 158: 168-173, 1991.
  9. Donis R O, Dubovi E T: Differences in virus induced polypeptides in cells infected by cytopathic and noncytopathic biotype of bovine virus diarrhea-mucosal disease virus. Virology. 158: 168-173, 1987.
  10. Inaba Y, Kurogi H: Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. Arch. Gesamte Virusforschung. 44: 121-132, 1974.
  11. Kahrs, R F: infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. JAVMA 171: 1055-1064, 1977.
  12. Kelling C L, Stine L C, Rump K K, Parker R E, Kennedy J E, Stone R T: Investigation of bovine viral diarrhea virus infection in a range beef cattle herd. JAVMA 197: 589-593, 1990.
  13. Otte, E: Virus disease of cattle in Taiwan. J Taiwan Assoc Anim Husb Vet Med 12: 1-22, 1968.
  14. Parks J B, Pritchett R F, Zee Y C: Buoyant density of bovine viral diarrhea virus. Proc Soc Exp Bio Med 140: 595-598, 1972.
  15. Phillips R M, Heuschele W P, Todd J D: Evaluation of a bovine viral diarrhea vaccine produced in a porcine kidney cell line. Am J Vet Res 36: 135-140, 1975.
  16. Timoney J F, Gillespie J H, Fredric W S, Barlough J E: In "Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals". 8th ed. 593-604, 1988.
  17. Wilhelmsen C L, Bolin S R, Ridpath J F, Cheville N F, Kluge J P: Lesions and localization of viral antigen in tissues of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhea. Am J Vet Res 52: 269-275, 1991.

## The Development of Multivalent Inactivated Vaccines Composed of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Bovine Viral Diarrhea, and Parain- fluenza-3 Viral Antigens

Yung-Kung LIAO\*, Yong-Siu LU, Shu-Yen CHIU, Yong-Lin LEE, Der-Tyan LIN,  
Dih-Fa LIN, Mau-Jinn KWANG, and Hsiang-Jung TSAI

*Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health*

MDBK cell line, fetal bovine testicle cells, fetal bovine muscle cells, fetal bovine kidney cells, and fetal bovine nasal mucosa (BNM) cells were tested for their ability to support the growth of the bovine viral diarrhea (BVD) virus. It was found that BVD virus had highest virus titers ( $10^{5.5}$  TCID /mL) when it was grown on BNM cells. Four multivalent inactivated vaccines composed of infectious bovine rhinotracheitis (IBR), BVD, and parainfluenza 3 (PI-3) were prepared. They were either inactivated by 0.2% v/v formalin or 0.1M BEI and were added with one of the two adjuvants (10% aluminum phosphate gel or 20% DEAE-Dextran). The concentrations of the antigens in the vaccines before inactivated and adjuvanted were as followings: IBR virus,  $10^7$  TCID /mL; BVD virus,  $10^5$  TCID /mL; PI-3 virus,  $10^{6.5}$  TCID /mL. Eleven calves were immunized with 5mL of one of the four inactivated vaccines when they were six months old. Four weeks later, all of them received a second dose. Two weeks after the last injection, it was found that the immunized calves had an IBR neutralizing antibody titers from 1: 4 to 1: 256, BVD neutralizing antibody titers from 1: 64 to 1: 4096, and PI-3 hemagglutination- inhibition antibody titers from 1: 32 to 1: 128. Formalin inactivated, DEAE-dextran adjuvanted vaccine had highest IBR antibody response; formalin inactivated, aluminum phosphate gel adjuvanted vaccine had highest BVD antibody response and lowest PI-3 antibody response ( $P < 0.05$ ). The vaccines were safe. No adverse reaction was observed in any cattle and mice inoculated with the inactivated vaccines.

---

\*Corresponding author