

## 豬水泡病不活化疫苗免疫效力探討

丁履紉\* 邱資峰 鍾明華 陳清

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 摘要

豬水泡病毒 TN1 株以 ESK 株化細胞增殖，病毒力價可達  $10^{8.1}$  TCID<sub>50</sub>/mL。病毒液以 0.004 M Binary ethylenimine 不活化後，與等量佐劑 Montinide ISA206 混合均勻試製成 W/O/W (Water in oil in water) 不活化疫苗。取 5 至 7 週齡第二代 SPF 小豬，豬隻間隔四週連續免疫兩次後，血清中和抗體表現極佳，力價可高達 3.79~3.88 log<sub>10</sub>，免疫組豬隻再以強毒攻擊，並移入健康同居感染豬同欄飼養，同時另取健康豬亦以強毒攻擊為攻毒對照組。實驗結果顯示，免疫豬攻毒後可得到良好的保護；同居感染豬也一切正常；而攻毒對照組鼻吻、膝、蹄冠部則有明顯病灶。

**關鍵字：**豬水泡病 (*swine vesicular disease*)

不活化疫苗 (*inactivated vaccine*)

### 緒言

豬水泡病於 1966 年在義大利首先發現 [8]，以後陸續在世界各地發生 [7]。台灣首次發生於 1973 年，至今仍偶有病例傳出。本病之死亡率雖低，但感染豬會有疼痛、跛行、生長發育遲緩等現象，而引起經濟上之損失。由於豬水泡病的臨床症狀與口蹄疫難以區別，故各國政府對本病均極為重視。

為了控制本病，先進國家均採取撲殺政策，但在撲殺方法不切實際時，疫苗免疫即成為唯一的方法，惟目前仍未有商品化疫苗問市。本所呂 [1, 2] 和鍾 [4, 5] 等曾經開發不活化疫苗，賴 [3] 等也曾進行研究開發活毒疫苗，均有良好的結果。根據 1999 年抗體調查結果，台灣豬水泡病抗體陽性率約為 6.81%，可見感染依然存在於豬場，故須注意本病有可能爆發流行。再則，大陸走私動物及畜產品猖獗，為防範未然，應積極開發有效之疫苗供緊急預防之用。本報告旨在評估利用效益較高的礦物油佐劑研製之不活化疫苗，其對豬隻的免疫效力和保護效力。

### 材料及方法

#### 病毒：

由製劑系分離之 TN1 病毒株做為種毒，供疫苗製造及攻毒用。

#### 細胞：

豬胎兒腎臟株化細胞 (ESK) 以含有 10 mM HEPES、30 μg/mL gentamicin、8 % 胎牛血清、0.075% NaHCO<sub>3</sub> 之 Eagle's MEM 培養，供病毒增殖和中和抗體力價測定用。

#### 病毒增殖不活化及疫苗製作：

當 ESK 細胞單層形成，接種 0.1 M.O.I. SVD-TN1 病毒，於 37°C 培養箱培養之，細胞變性完成時，收集病毒液。病毒液加入 0.004 M binary ethylenimine (BEI) 在 37°C 作用 12 小時，使病毒不活化。不活化之病毒再接種 ESK 細胞及 TSA agar 確認無殘留活病毒及無細菌污染後，才可製造疫苗。將等量不活化病毒液慢慢加入佐劑 Montinide ISA206 (Seppic) 中，以 2000 轉 5 分鐘混合均勻，W/O/W 不活化疫苗即製作完成。

\* 抽印本索取作者  
 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 不活化疫苗安全試驗評估：

#### 豬隻感染性安全試驗：

第二代 5 至 7 週齡 SPF 小豬四頭，分別於耳後肌肉注射 2 劑量 (4 mL) 不活化疫苗及蹄冠部皮下注射 0.5 mL 不活化疫苗，每日測量體溫，並至少觀察 10 天是否出現病徵。

#### 哺乳小白鼠毒性安全試驗：

3 至 4 日齡 ICR 哺乳小白鼠六隻，腹腔內注射 0.05 mL 疫苗，每日觀察是否出現病徵，至少觀察 7 天。

### 不活化疫苗效力試驗評估：

第二代 5 至 7 週齡 SPF 小豬十隻，取 6 隻耳後肌肉注射 1 劑量 (2 mL) 不活化疫苗，4 週後疫苗補強 1 劑量，再 2 週後攻毒。攻毒時除此 6 隻豬之外，再加入 2 隻為攻毒對照組，8 隻豬分別於蹄冠部皮下注射 0.5 mL 及鼻腔內點入 0.5 mL SVD TN1 病毒液，病毒力價為  $10^{8.1}$  TCID<sub>50</sub>/mL；剩餘 2 隻為同居感染組同欄飼養，評估是否會遭到免疫豬排毒感染。免疫後每日觀察是否出現病徵，免疫後 7 天每日測量體溫，每週採血，測定血清中和抗體力價。另外，攻毒前及後第 4、7、14、43 天採血，測定血清中和抗體力價。攻毒前及後第 1、2、3、4、7 天採咽喉液，以反轉錄聚合酶反應 (RT-PCR) 檢測是否有排毒現象；攻毒後每日仔細觀察是否出現病徵，並攻毒後 7 天每日測量體溫。

#### 血清中和抗體力價測定

血清先在 56°C 水浴槽中不活化 30 分鐘，保存於 -20°C 冰櫃待測。96 孔微量培養盤，取上述不活化處理的待測血清，從 2 倍稀釋至 8192 倍，每個稀釋倍數至少做 2 孔，每孔 0.05 mL。每稀釋階加入 0.05 mL 含有 200 TCID<sub>50</sub>/ml 豬水泡病病毒液。將培養盤置於 37°C 感作 1 小時。每孔加入  $3 \times 10^4$  細胞 / 0.1 mL 的 ESK 細胞懸浮液 0.1 mL。將培養盤置於 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培養箱 3 至 5 天，判定其中和抗體力價。

### RT-PCR 檢測方法

依照 TRIZOL RNA 萃取液之操作手冊的方法 (BRL)，將咽喉液先以 TRIZOL 萃取出 RNA，再進行 RT-PCR 反應。試驗所需之引子序列如下： SVDV2704f 5'-GAC AAC TTC GCC TAC TGG GT-3' 和 SVDV3400r 5'-CTT CCC ACA CAC AGT TTT GCC AGT-3'。取一 0.2 mL 離心管依序加入下項：10 μL RNA template、60.6 μL DEPC-DDW、10 μL 10X prozyme buffer (Protech)、8 μL dNTP (1.25 mM)、5μL Primer SVDV2704f (5μM)、5 μL Primer SVDV3400r (5μM)、0.4 μL rRNasin (BRL) (40U/μL)、0.5 μL AMV Reverse transcriptase (10U/μL, Promega)、0.5 μL Prozyme™ (1U/μL) 反應總體積為 100 μL。循環加熱器設定時間和溫度反應條件為 42°C 40 分鐘，94°C 2 分鐘。94°C 40 秒，50°C 40 秒，72°C 40 秒，總共 35 個循環，產物大小為 697 bp [9]。

### 結果

#### TN1 病毒株在 ESK 株化細胞之增殖性：

TN1 病毒株在 ESK 細胞呈圓形化 CPE，ESK 單層細胞接種 0.1 MOI 的病毒液，攻毒後第 2 天細胞變性完成時，所收穫之病毒液力價可達  $10^{8.1}$ TCID<sub>50</sub>/mL。

#### 豬水泡病 W/O/W 不活化疫苗之安全試驗：

##### 豬隻感染性安全試驗：

高劑量免疫豬隻後，10 天內並未發現任何局部的水泡病變或全身性不適。不過免疫後的第 2 天 4 隻豬體溫上升至 40.4~40.8°C，但第 3 天 4 隻豬即恢復正常體溫，我們認為應該是礦物油所造成的副作用之一。

##### 哺乳小白鼠毒性安全試驗：

腹腔注射免疫的哺乳小白鼠觀察 7 天，並未發現任何局部或全身性的症狀。但攻毒組的哺乳小白鼠於攻毒後第 3 天，4 隻中有 1 隻出現顫抖、步伐不協調及呼

吸困難等症狀，其餘 3 隻則僅出現輕微顫抖現象。

### 豬水泡病 W/O/W 不活化疫苗之效力試驗：

第 2 代 5 至 7 週齡 SPF 小豬，免疫 1 劑量 W/O/W 不活化疫苗，1 週後中和抗體力價即可上升至 1.81~2.41 log<sub>10</sub>，4 週後中和抗體力價即可達 2.41~3.34 log<sub>10</sub>，疫苗補強後更可高達 3.61~3.91 log<sub>10</sub>，且攻毒後第 43 天抗體力價依然持續維持 3.31~3.91 log<sub>10</sub>。攻毒對照組則於攻毒前時抗體力價皆低於 0.6 log<sub>10</sub>，攻毒後第 4 天抗體上升 0.9 及 2.71 log<sub>10</sub>，同居對照組於同欄飼養期間抗體力價沒有明顯變化（如表 1、圖 1）。

### 豬水泡病 W/O/W 不活化疫苗之保護效力試驗：

免疫組豬隻攻毒後體溫維持正常，並且未發現任何局部的水泡病變或全身性的症狀。然而攻毒組兩隻豬皆於攻毒後第

二天，出現高熱達 40.5°C，同時在第三天時皆發現跛行，鼻吻部、膝部、趾間和足冠狀帶出現水泡樣病變。同居感染組豬隻體溫維持正常，未發現任何局部的水泡病變或全身性的症狀。以 RT-PCR 檢測咽喉液是否有排毒現象，結果免疫組及同居對照組皆未檢出病原。而攻毒對照組則於攻毒後 1、2、3、4 天可於咽喉液檢出病原，第 7 天則無法檢出（如圖 2）。不活化疫苗之保護效力試驗結果請參閱表 3。

## 討論

TN1 病毒株在 ESK 細胞株增殖快速，病毒接種 0.1 MOI 後，第二天即可約見 90% CPE，而且力價高達 10<sup>8.1</sup> TCID<sub>50</sub>/mL，其增殖特性對疫苗之免疫效力有極大的幫助。

BEI 不活化劑僅破壞病毒的核酸，使病毒不具有感染性，不會破壞病毒表面抗原蛋白質而影響不活化疫苗的免疫效力。故可取代過去傳統所使用的福馬林不活化劑<sup>[10]</sup>。本實驗結果發現當 BEI 濃度為 0.004 M 於 37°C 作用 12 小時

表 1 SPF 豬免疫不活化疫苗後免疫組、攻毒對照組、同居對照組

		血清中和抗體力價 (log <sub>10</sub> )										
組別		PV1W0 <sup>1</sup>	PV1W1	PV1W2	PV1W3	PV2W0 <sup>2</sup>	PV2W1	DPI0 <sup>3</sup>	DPI4	DPI7	DPI14	DPI43
免疫組		0.6	2.11	2.71	1.81	3.31	3.61	3.61	3.91	3.61	3.91	3.31
		0.6	2.11	2.41	1.81	3.01	3.61	3.61	3.91	3.31	3.91	3.91
		0.6	1.81	2.11	2.41	2.71	3.61	3.61	3.61	3.91	3.61	3.31
		0.6	2.11	2.11	2.71	3.31	3.91	3.91	3.91	3.91	3.61	3.61
		0.6	2.41	2.71	2.41	3.01	3.91	3.91	3.91	3.91	3.91	3.61
		0.6	2.71	3.01	3.01	2.41	3.91	3.91	3.91	3.61	3.91	3.61
同居對照組		0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	1.2	0.6	0.6	0.6	0.6
		0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	1.2	0.6	0.6	0.6	0.6
攻毒對照組		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	2.41	2.71	ND <sup>4</sup>
		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	2.71	2.71	3.31	ND

<sup>1</sup>：第一次免疫後週數

<sup>2</sup>：第二次免疫後週數

<sup>3</sup>：攻毒後天數

<sup>4</sup>：未測試

圖 1 SPF 豬免疫不活化疫苗後免疫組、攻毒對照組、同居對照組

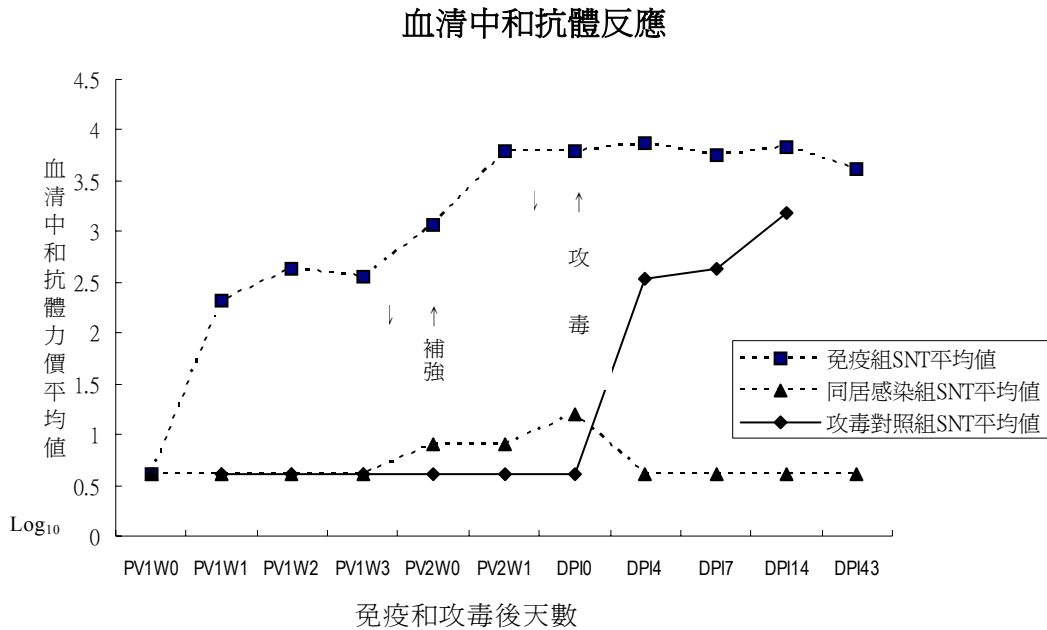
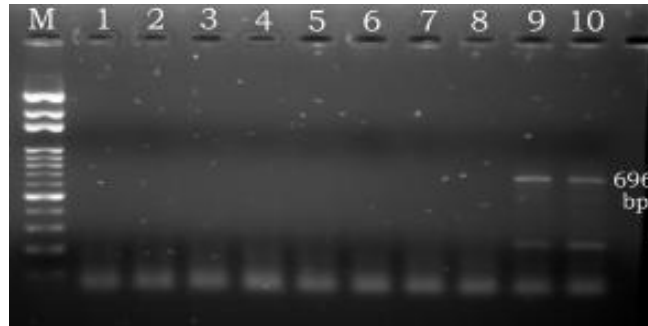


圖 2 豬隻攻毒後第四天採集咽喉液以 RT-PCR 檢測豬水泡病毒的結果



M : 100 bp DNA ladder 分子量標記； 1 : 免疫組 1 號豬； 2 : 免疫組 2 號豬； 3 : 免疫組 3 號豬； 4 : 免疫組 4 號豬； 5 : 免疫組 5 號豬； 6 : 免疫組 6 號豬； 7 : 同居對照組 1 號豬； 8 : 同居對照組 2 號豬； 9 : 攻毒對照組 1 號豬； 10 : 攻毒對照組 2 號豬

表 3 SPF 豬免疫不活化疫苗後之保護效力試驗

組別	試驗頭數	發熱反應	水泡病變	以 RT-PCR 疫苗保護效力 檢出 SVDV <sup>4</sup> (%)
免疫組	6	0/6 <sup>1</sup>	0/6 <sup>1</sup>	0/6 <sup>1</sup> 100
攻毒對照組	2	2/2	2/2	2/2 0 <sup>2</sup>
同居對照組	2	0/2	0/2	0/2 ND <sup>3</sup>

<sup>1</sup> : 發熱、水泡病變、檢出病毒頭數/試驗頭數

<sup>2</sup> : 未免疫疫苗

<sup>3</sup> : 未攻毒

<sup>4</sup> : 病材為咽喉液

後，取部份不活化病毒液，盲目接種 ESK 細胞株三代，未出現任何細胞病變，故 BEI 可以徹底殺死豬水泡病毒，不會殘存活病毒。

佐劑在疫苗的之免疫效力扮演極重要的角色，本所呂 [1, 2] 等曾使用  $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{saponin}$  為佐劑研製豬水泡病不活化疫苗，得到 100% 之保護效力，而先前我們曾使用礦物油(liquid paraffine)及 MVP 乳劑(MVP laboteries)兩種佐劑，研製豬水泡病不活化疫苗，僅得到 80% 之保護效力，推測可能與抗原在疫苗中的含量不同而造成的影響 [5]。根據 Barnett [6] 比較  $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{saponin}$  與 Montinide ISA206 兩種佐劑製作的口蹄疫不活化疫苗效力及穩定性的實驗結果，發現 Montinide ISA206 疫苗製造過程簡便、不需特殊的生產工具、容易刺激早期抗體生成、注射容易、穩定性較佳等優點，而且 4°C 保存期效較長，病毒抗原穩定性好；而  $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{saponin}$  疫苗 4°C 保存期效較短，可能與 VP1 抗原吸附在  $\text{Al}(\text{OH})_3$  時會造成物理性裂解，而使疫苗效力降低。

緊急用疫苗首要條件必需能快速產生保護性抗體，才能使動物達到立即的保護。除此之外，保護性抗體的維持期間要長，才能僅免疫一次即可長期保護，省去補強的麻煩。本實驗研製的豬水泡病 W/O/W 不活化疫苗所使用的佐劑為 Montinide ISA206，免疫小豬 1 劑量，1 週後保護性抗體力價可快速上升至  $1.81 \sim 2.41 \log_{10}$ ，4 週後中和抗體力價高達  $2.41 \sim 3.34 \log_{10}$ ，疫苗補強後更可高達  $3.61 \sim 3.91 \log_{10}$ ，且高抗體力價可持續維持 2 個月，故可達到緊急用疫苗之要求。免疫後具保護性抗體的豬隻，經強毒攻擊，並未出現任何症狀，而且從咽喉液中也沒有檢測到水泡病病毒，表示免疫組攻毒後，體內的保護性抗體能立刻將入侵的病毒中和，故不會出現病毒血症現象，得到 100% 之保護效力。綜觀以上結果，我們肯定應用 Montinide ISA 206 所試製的豬水泡病不活化疫苗，不僅能激起早期保護性免疫能力，而且能持續維持高抗體力價，更能有效阻止侵入的病毒增殖而降低病毒在豬場內的散播。

## 參考文獻

1. 呂榮修。豬水泡病研究。農復會補助家畜疾病研究計畫報告：1- 18, 1977。
2. 呂榮修、鍾明華、李永林、邱朝齊、賴秀穗。豬水泡病死毒疫苗之研究。農復會補助家畜疾病研究計畫報告：1- 14, 1977。
3. 賴秀穗、陳忠松、何維莊、黃天祥。豬水泡病活毒疫苗之研究—毒力復歸討論。農發會補助豬疾病之研究計畫報告：13- 17, 1981。
4. 黃金城、鍾明華、詹益波、李振宗。豬水泡病免疫擴散抗原之試品化。台灣省畜衛所研報 24：73- 82, 1988。
5. 鍾明華、李淑慧、丁履初、吳詩南、詹益波、邱資峰。豬特定傳染病不活化疫苗效力之探討。台灣省畜衛所研報 31：37- 41, 1995。
6. Barnett PV, Doel TR. Stability and potency studies with FMD vaccines prepared from antigens stored in the Pirbright Bank: comparisons between oil and  $\text{Al}(\text{OH})_3$  formulations. Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Pirbright, Working, Survey, GU24 ONF, U. K.
7. Done JT. Swine vesicular disease in the European community. Vet Rec 131: 246, 1992.
8. Nardelli L, Lodetti E, Gualande G.L, Burrows R, Goodridge D, Brown F, Cartwright B. A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. Nature (London) 219：1275- 1276, 1968.
9. Nunez JI, Blanco E, Hernandez T, Gomez-Tejedor C, Martin MJ, Dopazo J, Sobrino F. A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. J Virol Methods 72(2): 227- 35, 1998.
10. Tekerlekov P, Veleva E. Binary ethyleneimine as an inactivator of the foot-and-mouth disease virus. Vet Med Nauki 22(3): 3- 8, 1985.

## **Efficacy Evaluations of the Inactivated Swine Vesicular Disease Vaccine**

Ting, Lu- Jen , T. F. Chiou, M. H. Jong and C. Chen

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

### **SUMMARY**

Swine vesicular disease (SVD) virus, TN1 strain, was grown in ESK cells and reaching a titer of  $10^{8.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml. The SVD water/oil/water (W/O/W) vaccine was prepared from the virus inactivated with binary ethylenimine (BEI) and emulsified with Montanide ISA206. Ten specific pathogen free (SPF) pigs at 5-7 weeks of age were used to evaluate the inactivated SVD vaccine. Results revealed that the SVD vaccine elicited good titers of neutralizing antibodies ranging from 3.79 to 3.88 log<sub>10</sub> after two time vaccinations with a four-week interval. This vaccine also conferred protection for pigs post challenge, however the control pigs without receiving vaccination developed visible lesions on the snout, foot and dewclaw areas.

*Keywords: Swine vesicular disease, Inactivated vaccine, Water/oil/water vaccine, Specific pathogen free pigs*