

OIE

羊痘活毒疫苗安全及效力試驗

曾俊憲 本所製劑研究組

摘要

2008年6月於桃園縣爆發台灣第一起羊痘疫情，經撲殺210頭羊和羊舍消毒後疫情獲得控制。但2010年4月雲林縣再度爆發羊痘疫情，自4月9日至9月24日止，計有569羊痘發生場，全場撲殺有265場，免疫後部份撲殺場有304場，總撲殺淘汰頭數有23,221頭，約占台灣總飼養羊隻頭數的十分之一。本所緊急自約旦進口JOVAC Kenyavac SGP0240羊痘減毒活毒疫苗，並依據OIE（World Organisation for Animal Health）陸生動物疫苗標準進行羊痘活毒疫苗安全、效力試驗、病毒迷入否定試驗及田間試驗，結果各項試驗均合格。安全試驗結果顯示波爾山羊等7種品系羊隻以KSGP0240羊痘減毒活毒疫苗20劑量或1劑量皮下注射後，所有羊隻於21天觀察期中均無任何羊痘特異性病變或死亡。羊隻經KSGP0240疫苗1劑量免疫3週後以2010年羊痘野外強毒皮內接種之結果均符合OIE規範之免疫組病毒中和指數應大於未免疫對照組 $10^{2.5}$ 以上。田間試驗總計免疫4場603頭羊隻，其中懷孕母羊達150頭以上，流死產只見於感染場1胎2頭；實驗室以20劑量免疫加上野外毒攻毒未引起懷孕母羊流死產，胎兒剖檢正常無羊痘特異性病變。以上結果顯示本疫苗對肉羊及乳羊均安全無虞，不會影響乳羊泌乳量，免疫懷孕乳羊亦無流死產發生，故自6月25日全面施打疫苗以後，本次羊痘疫情已有效控制。

序言

羊痘係羊隻的一種高度傳染性病毒性疾病，以皮膚發紅疹（erythematous eruptions）為主要特徵。病程初期，病變呈現丘疹(popular)，隨後轉為膿疱疹（ustular eruptions），至全身性病變時，可能會有呼吸道和胃腸道黏膜出血性炎症反應發生並造成死亡。羊痘病毒，屬痘病毒科中之羊痘病毒屬。不同羊痘病毒株間雖然免疫原性相同（只有一種血清型），但病原性可能不一樣。病毒顆粒大小為 290 x 270 nm，病毒表面具有管狀小體構成絲狀結構。病毒核酸 DNA 長約 150 Kbp。在自然情況下，綿羊痘和山羊痘具有宿主特異性，彼此間具有抗原相關性。有些病毒株則會同時感染綿羊和山羊兩種動物。綿羊痘、山羊痘病毒與牛結節疹病毒彼此間核酸相似度高達 96% 和 97%。羊痘病毒經 56°C 2 小時，或 65°C 30 分鐘處理病毒即告不活化。對高鹼性或酸性 pH 值均有敏感性。對乙醚(20%)、氯仿和福馬林（1%）具敏感性。病毒經石碳酸（2%）15 分鐘即告不活化，對清潔劑例如十二基硫酸鈉具有敏感性。乾燥痂皮內之羊痘病毒於常溫下可存活數年；污染羊毛之羊痘病毒可存活 2 個月，而畜舍內可存活 6 個月。

羊痘為接觸性傳染病，經由直接接觸感染動物之排出氣體、鼻腔分泌物、唾液或乾燥痂皮，糞便及間接接觸污染病媒例如污染器械、車輛或墊料、飼料或草料等都會造成傳染。感染途徑包括皮內或皮下接種，或經呼吸、傷口皮膚和黏膜等途徑傳染。綿羊和山羊為羊痘病毒之自然宿主，有些動物亦可人工感染成功。有些品種羊隻對羊痘病毒具有抵抗力，但美利奴綿羊（Merino）則具有高度易感性。感染耐過後會呈現終生免疫，不會有慢性帶毒羊隻的發生。人則不具感受性。挪威 1879 年最先發生羊痘。1983 年義大利、1985-1989 年賽普路斯、1988 年希臘都曾發生過感染，但後經撲滅。1984 年孟加拉、2005 年越南發生後則尚未撲滅。目前發生地區包括非洲北部和中部地區、西南亞和中亞地區、中東、印度和中國大陸的一種地方性疫病。台灣於 2008 年 6 月下旬在桃園觀音鄉第一次發現羊痘病例兩場(觀光牧場)，經撲殺 210 頭羊和羊舍消毒後無疫情再發生。2009 年本所曾以間接螢光法（IFA）對全國 21 縣市 91 戶 2,664 支血清進行監測，皆為陰性。但 2010 年 4 月 9 日雲林縣再度爆發羊痘病例，自 2010 年 4 月 9 日至 2010 年 9 月 24 日止，計有 569 羊痘發生場，全場撲殺有 265 場，免疫後部份撲殺場有 304 場，總撲殺淘汰頭數有 23,221 頭，約占台灣總飼養羊隻頭數的十分之一。台灣自 6 月 25 日起實施羊痘全面免疫注射，至 8 月 12 日止，羊痘疫苗施打總頭數為 227,291 頭，注射率約達 99%。2010 年羊痘疫情造成損失包括撲殺補償費用、疫苗、實驗研究、縣市防疫所及注射人力費，最少 3 億元以上。

臨床症狀：病程初期，感染羊隻會有發燒、流淚、流涎和鼻腔分泌物的排出。約經 2 天後於羊毛較為稀疏部位皮膚例如鼠蹊、陰囊、尾巴腹面、眼瞼、腋下、唇部、頰部、鼻孔 (nostrils)、乳房和外陰部可見皮膚發紅疹。羊痘病變剛開始時呈紅斑點狀 (macules)，周圍皮膚輕微水腫，爾後轉變為丘疹，繼而為膿疱。膿疱有時會轉變為水疱 (vesicles)。當膿疱病變之表面乾掉後會形成薄痂皮 (scabs)。病變部壞死和脫落後可見無毛疤痕 (scar)。肺臟引起羊痘結節病變時，會產生支氣管性肺炎，咳嗽、喘息、大量鼻腔分泌物、抑鬱、厭食和消瘦。泌乳量下降，偶而會有流產現象發生。感染羊隻可能會於發病 20-30 天後恢復。羊痘在成羊一般較為良性，以皮膚病變為主要特徵，特別是在尾巴部位腹面皮膚，全身性症狀較為輕微，死亡率約為 5-10%。小羊，羊痘較為惡性，臨床上主要特徵為抑鬱、全身性和匯合性皮膚病變，並常發生口頰 (buccal)、消化道和呼吸道黏膜病變。當發生二次性細菌性混合感染時則會引起第二波的熱反應，嚴重時死亡率可高達 80%。

肉眼病變：活體或屍體檢查均可發現上述羊痘表皮或黏膜病變。死後剖檢時，病變周圍皮膚可見充血，並有不同程度水腫。全為或混雜著丘疹、水疱、膿疱、痘疤和痂皮病變。淋巴結腫大、類淋巴增生、水腫、鬱血性出血。小羊經常可見匯合性病變。斃死前若膿疱業已破裂，常會導致膿疱周圍羊毛無光澤。惡性型，羊痘病變會蔓延至口腔、咽、喉和陰道等黏膜。肺臟，常見灰色類淋巴瘤樣或乾酪化小結節，周圍呈肺炎病變。

診斷：田間，易感性羊隻發現有漸進性羊痘或類似羊痘病變時，應懷疑為羊痘的感染，尤其是羊隻曾經移動或從外面引進羊隻時。輕微型羊痘，由於病變僅局限於小部份皮膚區域，臨床上容易被忽略。羊痘有賴實驗室的最終確診。羊痘、濕疹和疥瘡常有類似痂皮病變的形成。濕疹，雖非傳染性疾病，但最後常會引發寄生蟲性疾病，若無混合感染，不會引起羊隻的熱反應。羊痘之口部病變和全身性症狀與小反芻獸疫容易造成混淆，但小反芻獸疫不會引起皮膚丘疹、膿疱和壞死性化膿性口炎，可予以區別診斷，所幸台灣無小反芻獸疫，不予考慮。台灣最主要的羊痘需與羊接觸傳染性化膿性口炎 (Orf) 做區別，羊接觸傳染性化膿性口炎最主要為於口部呈現增殖性病變。

病材採集：包括羊隻熱反應期間的血液、淋巴結和皮膚病變、急性發病期和疾病恢復後之配對血清等，以冷藏方式儘速送至本所疫學研究組供實驗室確診。實驗室診斷：新鮮病變抹片染色後可見典型包涵體、電子顯微鏡檢查羊痘病毒顆粒、螢光抗體染色、病毒分離和聚合酶鏈反應。病毒分離，可採用小羊睪丸和腎臟初代細胞培養，或 OA-3 綿羊睪丸株化細胞。利用病毒中和試驗、補體結合試驗、瓊脂凝膠免疫擴散試驗、間接螢光標示抗

體染色試驗、ELISA 等方法檢測配對血清之特異性抗體。

預防和控制：目前無有效治療方法，活毒減毒疫苗注射是預防羊痘首要步驟，養羊場平時應做好自家生物防衛，於引進羊隻前需先予隔離檢疫。現場如發現疑似羊痘感染羊隻應儘速通知當地縣市家畜疾病防治所，經確診為羊痘感染時羊隻應儘速撲殺並妥善處理羊隻屍體和產物。感染區動物和車輛進行移動管制及嚴格執行消毒。

進口羊痘疫苗

2010 年 5 月 3 日委託進口 300 劑約旦 JOVAC Kenyavac SGP0240 羊痘減毒活毒樣品疫苗運抵本所，於 5 月 7 日依據世界動物衛生組織（OIE）陸生動物疫苗標準分別以肉羊及乳羊進行安全、效力及田間試驗。後續進口 3 批疫苗總計 38 萬劑供羊隻防疫使用，並自 6 月 25 日開始提領實施羊痘全面免疫注射，至 8 月 12 日止，羊痘疫苗施打總頭數為 227,291 頭，注射率約達 99%。

一、羊痘疫苗實驗室試驗

（一）材料

以 7 種品系 66 頭山羊及乳羊依據世界動物衛生組織陸生動物疫苗標準進行安全及效力試驗，詳如表 1。

（二）方法

1. 病毒活體增殖：以 2010 年本所分離之羊痘強毒株（10H16-3）皮內接種、刮傷感染及呼吸道感染模式，進行病毒活體增殖及病變觀察。
2. 攻毒模式建立：將攻毒用羊痘強毒株以滅菌 PBS 做連續性 10 倍稀釋，共 6 個稀釋倍數即自 10^{-1} 至 10^{-6} 分別接種於山羊側腹部皮膚，皮內接種 0.1ml，每一稀釋倍數接種 4 個部位，每隻動物共接種 24 個部位，連續觀察 14 日。
3. 病毒迷入否定試驗：以 1 劑疫苗與 1 mL 羊痘病毒抗血清（IFA 1280 倍）於 37°C 1 小時作用後皮下注射羊隻。經 14 日連續觀察及體溫測量結果需為，接種羊隻健存、無任何臨床症狀、體溫正常、剖檢無特異性病變。

4. 疫苗安全試驗：每一品系羊隻 3 頭，採肘後股內皮下注射 20 劑量疫苗 1 頭、1 劑量疫苗 2 頭，接種後連續 21 日觀察及體溫測量結果需為接種羊隻健存、無任何臨床症狀及無特異性皮膚病變產生。
5. 疫苗效力試驗：每一品系羊隻取 1 劑量疫苗安全試驗合格羊隻 2 頭及未免疫對照羊隻 1 頭，依攻毒模式建立方法進行羊隻活體攻毒，皮內接種攻毒後連續觀察 14 天，免疫組病毒中和指數應大於未免疫對照組 $10^{2.5}$ 以上。
6. 懷孕母羊疫苗安全試驗：以懷孕 4 週之阿爾拜因乳羊 1 頭注射 1 劑量疫苗及懷孕 4 週之波爾山羊 1 頭注射 20 劑量疫苗，接種後連續 21 日觀察，試驗合格後以 2010 年羊痘野外強毒皮內接種進行羊隻活體攻毒，皮內接種攻毒後連續觀察 35 天，懷孕母羊需無流死產、無臨床症狀及皮膚病變產生，剖檢母羊及胎羊無特異性病變產生。

(三) 結果

1. 病毒活體增殖：皮內接種感染羊隻於感染後第 6 至 9 日體溫上升高達 41°C 以上（圖 1），接種部位明顯腫脹，直徑達 1.5 cm 以上（圖 2），感染後第 11 日呈全身性發痘病變（圖 3）。刮傷感染羊隻於感染後第 9 日體溫上升達 41°C 以上，感染後第 32 日皮膚刮傷和吸入感染羊隻皮膚開始產生痘病變並且體溫持續上升達 41°C 以上（圖 4）。無論皮內、刮傷或吸入感染，於感染後第 60 日羊隻皮膚均呈現多處直徑約 0.5 至 2.0 公分之 stonepox 病變（圖 5），剖檢以增殖性間質性肺炎及腸繫淋巴結嚴重腫大為主要病變（圖 6）。
2. 攻毒模式建立：土山羊、奴比亞、吐根堡及阿爾拜因乳羊於皮內接種後第 36 至 48 小時，病毒接種部位呈現直徑約 0.5 至 1.0 cm 之水腫病變，接種後第 48 至 72 小時之水腫病變直徑約 1.0 cm，接種 72 小時以後之水腫病變直徑約 1.5 cm。相對於上述 4 種品系羊隻而言，其餘品系羊隻於皮內接種後之皮膚水腫病變較輕微，而且水腫病變發生較慢，但本次使用之 2010 年羊痘病毒對所有品系羊隻皮內接種之病毒攻毒力價均可達 10^5 濃度以上。
3. 病毒迷入否定試驗：經 14 日連續觀察及體溫測量結果為接種羊隻健存、無任何臨床症狀、體溫正常、剖檢無特異性病變。臟器乳劑上清液病毒分離結果為陰性。

4. 疫苗安全試驗：連續觀察 21 日，除疫苗接種部位呈現大小不等腫大外，並自接種後第 5 天起逐漸消退，試驗羊隻健存，無臨床症狀及體溫異常情形發生（表 2）。
5. 疫苗效力試驗：皮內接種攻毒後連續觀察 14 天，所有羊隻品系疫苗免疫組病毒中和指數均大於未免疫對照組 $10^{2.5}$ 以上（表 3）。免疫組羊隻皮內接種後皮膚僅短暫呈現水腫病變，約 10 日左右即恢復正常，不會演變成局部或全身性典型發痘病變（圖 7），剖檢亦無羊痘典型病變（圖 8）。
6. 懷孕母羊疫苗安全試驗：免疫 1 劑量疫苗之懷孕阿爾拜因乳羊及免疫 20 劑量疫苗之懷孕波爾山羊以 2010 年羊痘野外強毒皮內接種攻毒後連續觀察 35 天，懷孕母羊無流死產、無臨床症狀及皮膚病變產生，剖檢母羊及胎羊均無特異性病變產生（圖 9）。

二、羊痘疫苗田間試驗

田間試驗總計免疫 4 場 603 頭羊隻，其中懷孕母羊達 150 頭以上，流死產只見於感染場 1 胎 2 頭，其餘羊隻均無不良反應（表 4）。

結論

整體而言，2008 年首次傳出疫情以後後續追蹤未果、大量未登記飼養戶的無法掌握及拍賣場的羊隻繫留與回養可能是導致疫情爆發的主要因素。經由疫苗安全及效力試驗結果證實 KSGP0240 活毒減毒疫苗對波爾等 7 種品系羊隻具高度安全性及良好之疫苗效力。於 2010 年 6 月 25 日全面施打疫苗後即時發揮效果，羊痘疫情已獲得控制。經由本次疫苗全面施打使未登記飼養戶透明化（235 戶發病場），對將來羊隻防疫具有正面助益。雖然所有實驗數據均顯示懷孕母羊不會因為施打 KSGP0240 活毒減毒疫苗造成流死產，但因為現場環境變數較多，例如溫度、驚迫、飼養密度、飼養型態、營養及該場羊隻健康狀況均可能影響疫苗對懷孕母羊安全性，所以避開懷孕期施打本疫苗可能是一個更好的選擇。

表 1、羊痘活毒疫苗安全及效力試驗使用材料

品名	說明	數量	來源
羊痘活毒疫苗	KSGP0240 疫苗毒	3 瓶 (100 劑量/瓶)	約旦
羊痘痂皮乳劑	10H16-3 (2010 年)	3 mL	疫學研究組
羊痘細胞培養病毒液	R1520 OA3-5 (2008 年)	3 mL	疫學研究組
	10H16-3 OA3-1 (2010 年)	1 mL	疫學研究組
羊痘血清	2010 年羊痘病例	1 mL (IFA 1280x)	疫學研究組
羊隻	本地、金門、三品種、奴比亞、波爾、阿爾拜因、撒能、吐根堡。	66 頭	畜產試驗所、嘉南羊乳、台中縣羊場。

表 2、羊痘活毒疫苗安全試驗結果

品系	劑量	結果
本地山羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
三品種山羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
波爾山羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
阿爾拜因乳羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
撒能乳羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
奴比亞乳羊	1	合格 ^a
	1	
	20	
吐根堡	1	合格 ^a
	1	
	20	

^a: 連續觀察 21 日，試驗羊隻健存，無臨床症狀及體溫異常情形發生。

表 3、羊痘活毒疫苗效力試驗結果

品系	劑量	力價(log ₁₀)	中和指數 (NI)
本地山羊	1	0	6.0
	1	0	6.0
	0	6.0	0
三品種山羊	1	2.5	3.0
	1	2.33	3.17
	0	5.5	0
波爾山羊	1	0	5.67
	1	2.0	3.67
	0	5.67	0
阿爾拜因乳羊	1	2.0	3.0
	1	2.5	2.5
	0	5.0	0
撒能乳羊	1	2.5	3.0
	1	3.0	2.5
	0	5.5	0
奴比亞乳羊	1	1.0	4.33
	1	0	5.33
	0	5.33	0
吐根堡	1	2.0	3.33
	1	2.5	2.83
	0	5.33	0

表 4、羊痘活毒疫苗田間試驗結果

地點	羊隻品種	試驗頭數	結果	附註
台南縣	撒能、阿爾拜因	122	正常	6/17/10 免疫
台東縣	奴比亞	17	正常	6/21/10 免疫
嘉義縣 A	泌乳及懷孕乳羊	40	正常	6/23/10 免疫
嘉義縣 B	泌乳及懷孕乳羊	424	免疫前發病 13 頭，免疫後發病 33 頭	最後發病為免疫後 9 天；第 14 天流產 1 胎 2 頭

說明：嘉義縣 B 場為羊痘感染場。

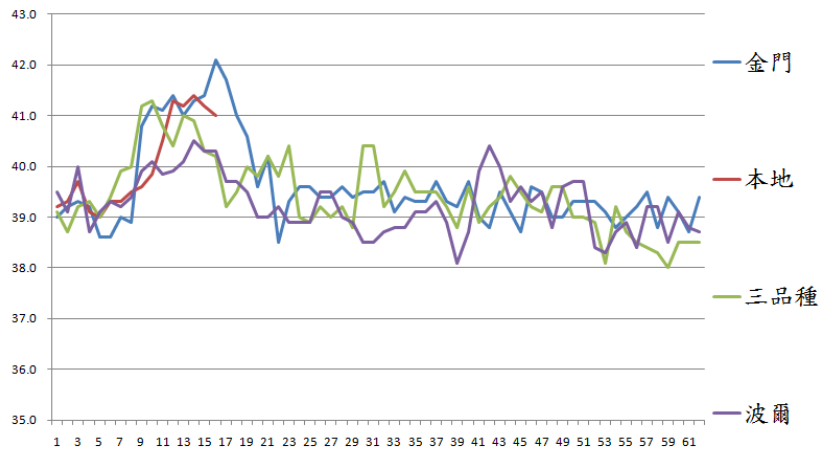


圖 1、羊隻皮內接種羊痘強毒體溫變化。

(A)



(B)

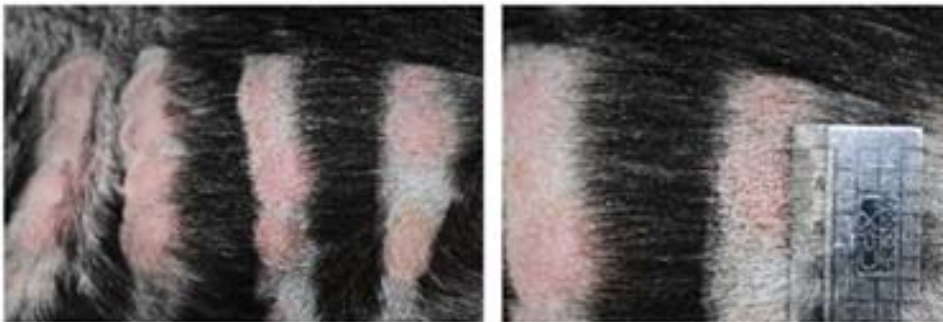


圖 2、金門山羊皮內接種羊痘強毒之皮膚水腫病變。

(A) 接種後第 6 日病變直徑達 1.5 cm，(B) 接種後第 7 日病變直徑達 2.0 cm。



圖 3、皮內接種羊痘強毒後第 11 日於羊隻全身引發直徑 1 至 2 公分不等之痘病變。

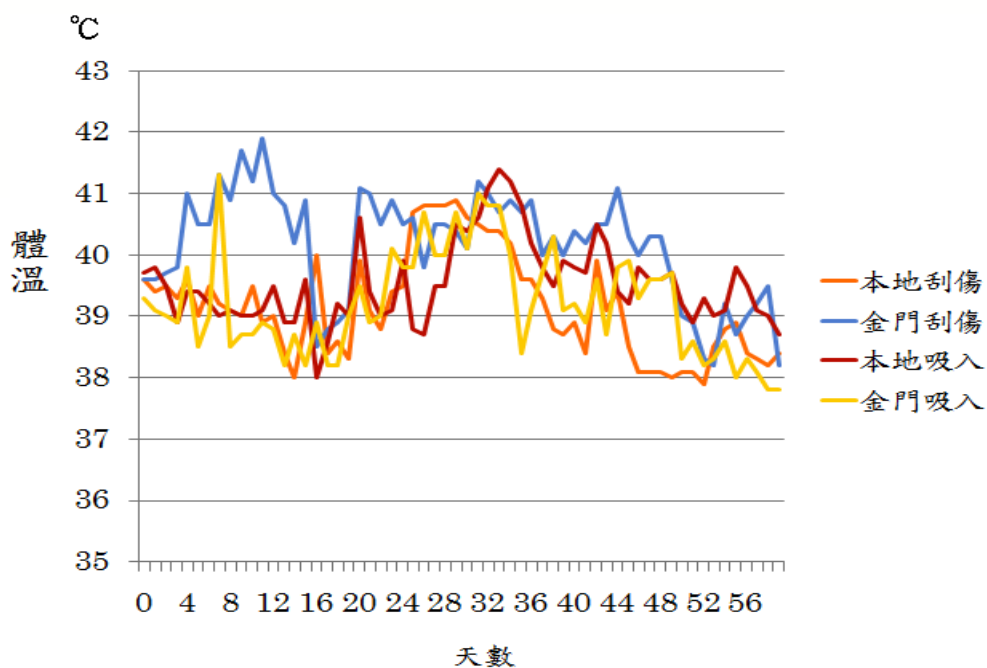


圖 4、羊隻刮傷及吸入接種羊痘強毒體溫變化。



圖 5、皮內接種羊痘強毒後第 60 日羊隻皮膚均呈現多處直徑約 0.5 至 2.0 公分之 stonepox 病變。

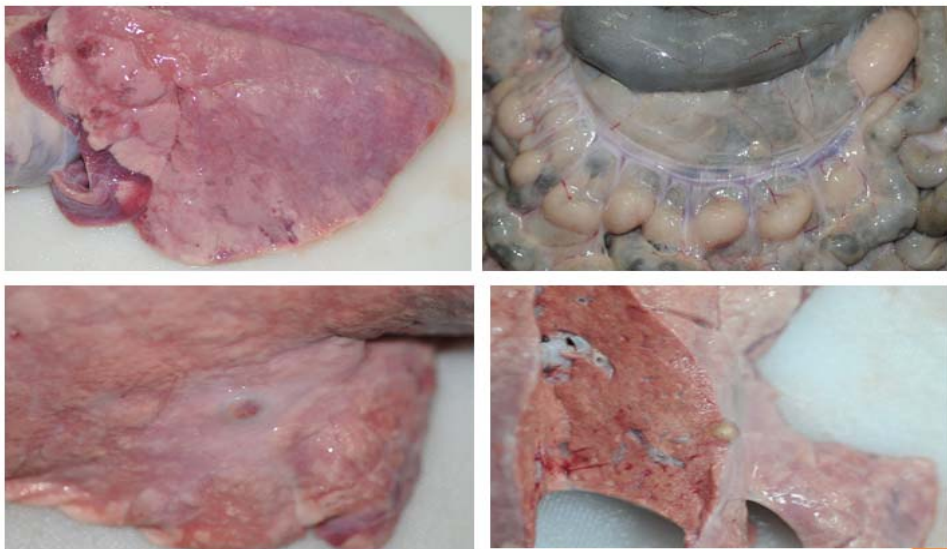


圖 6、皮內接種羊痘強毒後第 60 日，剖檢以增殖性間質性肺炎及腸繫淋巴結嚴重腫大為主病變。

攻毒後第5日



對照未免疫組

攻毒後第10日

1劑量免疫組

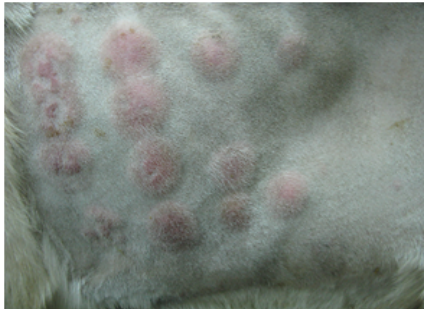


圖 7、羊痘活毒疫苗效力試驗：活毒疫苗免疫後 3 週以羊痘強毒皮內接種攻毒，免疫組羊隻皮膚無發痘病灶。



免疫組攻毒後第28日



未免疫對照組攻毒後第28日



未免疫對照組攻毒後第28日



未免疫對照組攻毒後第28日

圖 8、羊痘活毒疫苗效力試驗：活毒疫苗免疫後 3 週以羊痘強毒皮內接種攻毒，攻毒後第 28 日剖檢，免疫組羊隻實質臟器無明顯病灶，對照未免疫組羊隻肺臟呈現增殖性肺炎，腸繫淋巴嚴重腫大。



圖 9、羊痘活毒疫苗對懷孕母羊安全性評估：懷孕 4 週波爾山羊皮下接種 20 劑量 KSGP 0240 疫苗，3 週後以 2010 年羊痘野外毒攻毒，攻毒後 5 週剖檢，結果免疫後及攻毒後均未引發流死產，胎羊健存，剖檢無特異性病變。