

2005 至 2010 年禽流感 H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗檢驗

陳炳義*、林俊達、黃小倩、葉修如、陳瑞祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 配合政府家禽流行性感冒防疫政策，本分所執行禽流感 H5 亞型及 H7 亞型不活化儲備疫苗與疫苗銀行樣品檢驗業務。於 2005 至 2010 年間共送檢 H5 亞型疫苗 17 批，H7 亞型疫苗 13 批，其特性試驗、無菌試驗、防腐劑含量試驗、安全試驗、力價試驗、不活化試驗皆符合採購規格。嘗試以美國農業部動植物防疫檢疫局獸醫服務處獸醫生物藥品中心 (USDA-APHIS-VS-CVB) 之規定，評估我國儲備之禽流感疫苗效力。根據檢驗結果發現，力價試驗判定若參考美國規定，改由 3 週血清 80% 雞隻血球凝集抑制 (hemagglutination inhibition; HI) 抗體力價 16 倍以上變更為 32 倍以上，則試驗結果有 30% (9/30) 批次疫苗需採集 4 週血清才能達到。

關鍵詞：禽流感、不活化疫苗、力價試驗

緒言

禽流感主要感染的動物對象為雞及火雞，並根據病毒對雞的感受性，可以區分為高病原性禽流感 (Highly pathogenic avian influenza; HPAI) 及低病原性禽流感 (Low pathogenic avian influenza; LPAI)。高病原性禽流感病毒造成感染雞隻急性大量死亡，其病毒株亞型主要為 H5 或 H7 亞型，但並非所有的 H5 及 H7 亞型病毒都會造成 HPAI，而 LPAI 病毒不會造成雞隻嚴重的死亡，但是如病毒持續循環於雞場，會造成雞隻不同程度的呼吸道疾病、緊迫及產蛋率下降等較緩和的臨床症狀[6]。由於禽流感病毒的核酸具高度變異的特性，早期世界各先進國家皆以撲殺及清除病毒作為最主要的控制方式，但世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties; OIE) 認為正確使用安全有效的疫苗可預防禽流感疫情 [13]，來達到改善動物健康、動物福利、公共衛生及農業永續發展。

政府於 94 年召開中央防治重要動物傳染病因應小組第十一次會議，並依據該會議之決定，積極著手

籌備高病原性家禽流行性感冒疫苗之儲備，來因應當疫情發生時，配合政策緊急使用於疫情之控制。96 年召開高病原性家禽流行性感冒疫苗儲備會議，研商結果為併行採用疫苗銀行方式儲備疫苗。本分所為配合政府防疫政策，執行 H5 亞型及 H7 亞型不活化儲備疫苗與疫苗銀行樣品檢驗業務。2005 至 2010 年間已檢驗 H5 亞型不活化疫苗 17 批，H7 亞型不活化疫苗 13 批 (表 1)，並依據採購規格進行特性試驗、無菌試驗、防腐劑含量試驗、安全試驗、力價試驗、不活化試驗。本研究整理 2005 至 2010 年間送檢禽流感疫苗之檢驗數據，並收集各國相關家禽流行性感冒疫苗檢驗規範進行疫苗檢定及疫情控制之討論。

材料與方法

政府為預防禽流感疫情，藉由疫苗銀行的公開招標方式，規定投標廠商需將禽流感疫苗樣品送經本分所檢驗合格後，始取得比議價之權利；而購入禽流感儲備疫苗前，需將疫苗樣品送至本分所檢驗合格後，

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

始完成採購程序。本分所依採購規格進行下述之試驗。

特性試驗

需具固有理學的性狀，且無異物及異常氣味。

無菌試驗

一、細菌否定試驗

將血液培養基及Thioglycollate (TGC) 培養基，置於無菌操作箱後以無菌接種環沾少量疫苗塗抹於上，並取枯草桿菌做為陽性對照，滅菌後之PBS做為陰性對照，置入37 °C培養箱內，2至10日觀察試驗結果。

二、黴菌否定試驗

抽取疫苗0.2 mL培養於Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 中，以黑麴菌做為陽性對照，滅菌後之PBS做為陰性對照，置於25°C (室溫) 培養2至10日觀察試驗結果，如結果難判定，可再培養於Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 培養基3至5日，觀察是否有黴菌生長。

三、黴漿菌否定試驗

抽取疫苗0.2 mL培養於Pleuropneumonia Like Organism Broth (PLOB) 中，以黴漿菌做為陽性對照，滅菌後之PBS做為陰性對照，置入37 °C、5 % CO₂培養箱內，觀察14天是否有黴漿菌生長。

防腐劑含量試驗

一、蟻醛 (Formaldehyde)

(一) 疫苗及標準品前處理

取待測疫苗1 mL、Formalin 標準液(濃度0.1%) 各0、1.0、2.0、3.0、4.0及5.0 mL，加去離子水準確至10 mL，其濃度分別為0%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%及0.05%後，分別與10% NaCl 2 mL及chloroform 3 mL加入15 mL離心管，充分混合均勻，另取1 mL去離子水亦做前處理作為陰性對照(blank)。在室溫中，以1000 xg(2400 rpm, KUBOTA KN-70) 離心5分鐘，進行液面分離。將上層(水層)吸到新的15 mL離心管中，再加去離子水至5 mL刻度處，下層氯仿須倒至含氯廢液桶。

(二) 分光光度計檢測

準確取前處理之疫苗及各濃度之標準液0.1 mL至15 mL離心管中，每一管分別加入冰醋酸-醋酸銨混合液2 mL，再加入乙基丙酮-無水酒精混合液2 mL，

混合均勻。置於60°C水浴槽加熱15分鐘後再放置於冷水(4°C)中5分鐘後，置於室溫中20分鐘。取2 mL溶液置於比色管，以分光光度計410 nm波長測定吸光值。待測疫苗經與標準品曲線比較，蟻醛(Formaldehyde)含量須為0.2%以下。

二、柳硫汞 (Thimerosal)

(一) 疫苗前處理

取待測疫苗1 mL與10% NaCl 2 mL及chloroform 3 mL加入15 mL離心管，充分混合均勻，另取1 mL去離子水亦做前處理作為陰性對照(blank)。在室溫中，以1000 xg(2400 rpm, KUBOTA KN-70) 離心5分鐘，進行液面分離。將上層(水層)吸到新的15 mL離心管中，再加去離子水至10 mL刻度處，下層氯仿須倒至含氯廢液桶。取Thimerosal標準液(濃度200 μg/mL) 各0、2.5、5及7.5 mL，加去離子水準確至10 mL，其濃度分別為0 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL及150 μg/mL。

(二) 分光光度計檢測

取前處理之疫苗及各濃度之標準液0.5 mL至50 mL離心管中，加去離子水至5 mL處，每一管分別加入2N硫酸溶液5 mL和雙硫腺溶液10 mL，震盪混合均勻3分鐘，靜置使液面分離，除去上層液(水層)，將下層的四氯化碳層加入去離子水10 mL激烈震盪1分鐘(四氯化碳層呈綠色)，靜置使液面分離，除去上層液，再加入氨水溶液10 mL，激烈震盪1分鐘，靜置使液面分離，去除上層液，留下層，經濾紙過濾至15 mL離心管中。取1 mL溶液置於比色管，以分光光度計480 nm 波長測定吸光值。待測疫苗經與標準品曲線比較，柳硫汞(Thimerosal)含量須為0.01%以下。

安全試驗

選2至4週齡無特定病原(Specific Pathogen Free, SPF)雞12隻，任取2隻為對照，其餘10隻SPF雞，每隻分兩部位皮下各注射1劑，注射後觀察3週，均無不良反應而健存。

力價試驗

選3至4週齡SPF雞12隻，任取2隻為對照，試

驗雞 10 隻各免疫 1 劑量，21 日後抽血測定血球凝集抑制抗體力價 (hemagglutinin inhibition; HI)。送檢廠商需提供同型檢驗用血球凝集 (hemagglutinin; HA) 抗原 (HA 力價須達 256 倍以上，數量至少 2 ml)，及 2 ml 標準陽性血清、2 ml 陰性血清。血清與同型抗原進行血球凝集抑制試驗，其 HI 抗體力價須 80% 以上雞隻達 1:16，陰性對照組須 1:4 以下，若 21 日檢測 HI 抗體力價 1:16 者未達 80% 以上，則於 28 日再抽血檢測 HI 抗體力價，須 80% 以上雞隻達 1:16，陰性對照組須 1:4 以下。

不活化試驗

取適量疫苗 (約 0.1 至 0.2 ml) 以尿囊腔接種方式接種於 9 至 11 日齡 SPF 雞胚胎蛋，3 日後取尿囊液檢測血球凝集性並再次接種 SPF 胚胎蛋，重複三代，以確認疫苗不含家禽流行性感冒活病毒。

結果

特性試驗、無菌試驗、防腐劑含量試驗

H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗樣品計 30 批之特性試驗皆符合固有理學的性狀，無異物及異常氣味；無菌試驗皆無發現細菌、黴菌及黴漿菌生長；防腐劑含量試驗亦皆符合蟻醛 (Formaldehyde) 含量為 0.2% 以下之標準，柳硫汞 (Thimerosal) 含量為 0.01% 以下之標準。

安全試驗

H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗樣品計 30 批進行兩部位皮下各注射 1 劑量 (雙倍劑量) 之 SPF 雞及對照雞，於注射後觀察 3 週，均無不良反應而健存。

HI 力價試驗

SPF 試驗雞免疫 1 劑量，免疫後 3 週及 4 週採集血清，以與各送檢廠商提供之抗原、標準陽性血清及陰性血清，進行 HI，測定抗體力價。H5 亞型疫苗免疫後 3 週及 4 週血清之 HI 抗體力價如表 2，17 批 H5 亞型疫苗皆符合採購規格之標準，其中 15 批在免疫 3 週後血清之 HI 抗體力價即可符合，2 批需在免疫 4 週後血清之 HI 抗體力價才符合。H7 亞型疫苗免疫後 3 週及 4 週血清之 HI 抗體力價如表 3，13 批 H7 亞型疫苗皆符合採

購規格之標準，其中 7 批在免疫 3 週後血清之 HI 抗體力價即可符合，6 批需在免疫 4 週後血清之 HI 抗體力價才符合。

不活化試驗

H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗樣品計 30 批進行不活化試驗，經雞胚胎蛋三代繼代後尿囊液之血球凝集試驗結果皆不產生凝集現象，胚胎亦皆無異常，表示無家禽流行性感冒活病毒存在。

討論

2005 至 2010 年禽流感 H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗樣品 30 批之特性試驗、無菌試驗、防腐劑含量試驗、安全試驗、力價試驗、不活化試驗結果皆能符合採購規定，其中安全試驗及不活化試驗參照日本動物用生物學的製劑基準中禽流感不活化疫苗安全試驗標準而訂定 [3]，目的為確保雙倍劑量下雞隻免疫後的安全耐受性及疫苗抗原完全不活化的確認，避免造成經由免疫來源的疫情傳播，試驗結果顯示疫苗安全性良好以及無發現家禽流行性感冒活病毒存在。

早期在實驗室裡使用單向輻射免疫擴散法 (Single Radial Immunodiffusion; SRID) 來計算抗原含量，作為評估禽流感不活化疫苗的有效性 [5, 14]，但由於 SRID 試驗方法的複雜度高，所以目前均是採集禽流感不活化疫苗免疫雞隻之血清，進行血球凝集抑制試驗 (HI) 抗體力價之判定，但有些亞型的不活化疫苗會使用低病原性的病毒進行免疫雞隻攻毒後，計算個體發病率和病毒在呼吸道及胃腸道增殖的減少數量，來作為疫苗免疫效果的評估 [13]；也有使用高病原性禽流感病毒 (HPAI)，作為免疫雞隻之攻毒試驗，來判別是否具有保護力 [13]。但因為高病原性的禽流感病毒屬於生物危害第 3 等級 (Risk Group 3; RG3) 以上的病原體，需要在符合生物安全第 3 等級 (Biosafety Level 3; BSL3) 或 BSL2+ 以上的實驗設施來進行試驗，並透過負壓、HEPA 過濾及人員生物安全裝備等軟硬體設備，來阻擋病原在試驗過程中擴散出去，防止人為造成的傳播感染 [2, 13]。目前世界各國對於禽流感不活化疫苗力價測定的檢定規範，

幾乎都採用血球凝集抑制試驗 (HI) 抗體力價來做為判定依據。

對於禽流感疫苗免疫後陽性抗體保護力價，世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties；OIE) 認為血球凝集抑制試驗 (HI) 抗體力價達16倍以上，即可以對免疫動物達到保護作用。此外，中國大陸廣東檢驗檢疫局在2010年11月17日香港發佈禽流感病例時，為確保禽流感疫苗的免疫效果，針對流感抗體監測作出嚴格規定，要求禽流感免疫後HI抗體力價100%達到32倍水準以上的同群活禽才准予供應港澳，確保所有供應港澳活禽達到較高安全保護水準[4]。

美國農業部動植物防疫檢疫局獸醫服務處獸醫生物藥品中心 (USDA-APHIS-VS-CVB) 為增殖及保存禽流感部分亞型種毒的地方，可供應製造禽流感不活化疫苗的種毒株來源，同時該生物藥品中心禽流感不活化疫苗的檢定規定，在力價試驗以免疫3週血清進行血球凝集抑制試驗 (HI)，80%雞隻抗體力價需達32倍以上[9]。而日本動物用生物學的製劑基準中禽流感不活化疫苗力價試驗標準，規定全體免疫雞隻3至4週血清之血球凝集抑制試驗 (HI) 抗體力價需達16倍以上[3]。參照我國現行禽流感不活化疫苗採購規格及表2及3的力價結果來探討，若要符合美國獸醫生物藥品中心的標準，30% (9/30) 的批次疫苗需要等到免疫後4週血清才能達到80%雞隻抗體力價32倍以上，其餘70% (21/30) 3週血清力價可直接符合美國標準。若改以日本之檢驗標準 (三至四週之HI抗體力價100%達到16倍以上) 重新檢視，因其中共有6批次疫苗3週血清已達現行採購規定80%以上雞隻達16倍以上，無再採集4週血清進行力價測定，故有20% (6/30) 無法進行判定。其餘順利採集檢體之24批次疫苗，三週時HI抗體100%

達到16倍以上之合格場數為15批次，四週時之合格場數為5批次，合格率为67% (20/30)。其它世界各國檢定標準如歐洲藥典、中華人民共和國獸藥典、東南亞國協動物疫苗檢驗標準無禽流感不活化疫苗檢定的章節描述[1,7,10]。

由前述比較得知，禽流感疫苗免疫後陽性抗體保護力價最低為16倍，廣東檢驗檢疫局甚至要求到免疫群體達32倍的保護力價，相對應到疫苗檢定力價判定，若要修正現行採購規範為日本標準，即全體免疫雞隻抗體力價達16倍以上，依檢驗結果看來3週與4週血清依然無法達到；但若修正為美國標準，即提高力價為32倍以上，3週與4週血清可以達到80%免疫雞隻抗體力價達32倍以上，且在免疫雞隻數量百分比數達檢定標準力價考量上，訂定最低百分比數與百分百數免疫雞隻達檢定標準力價相比較，最低百分比數可減少少數免疫雞隻，因雞隻個體或人為環境因素等，而未達標準力價，來質疑疫苗的效力，並需要再重新確認，耗錢又耗時。

1994年墨西哥H5N2禽流感及2004年巴基斯坦的H7N3禽流感爆發後，該國政府皆使用不活化疫苗進行緊急防疫，卻因沒有適當的配套監控措施，造成禽流感病毒持續存在並被分離出[11,12]。反之，2002年香港的H5N1禽流感及1999年義大利的H7N1及2003年H7N3禽流感爆發，除了進行不活化疫苗緊急防疫外，並採取了個別適用的配套監測措施，為疫苗免疫控制成功的案例[6,8,14]。我國為符合國際間禽流感防疫策略，政府於96年高病原性家禽流行性感疫苗儲備會議中，研商結果為除了併行採用疫苗銀行方式採購儲備疫苗外，亦加強國內家禽場主動監測及可疑病例之被動性監測，來達到預防疫情及爆發疫情控制的管理成效，進而減少疫情傳播鄰國間的災害，建立良好的國際防疫形象。

表 1、2005 至 2010 年禽流感不活化疫苗送檢批次數量

亞型	送檢年度				合計
	2005	2007	2008	2010	
H5N2	8	2	—	2	17
H5N9	—	3	2	—	
H7N1	5	2	—	—	13
H7N3	2	2	1	1	

2005 至 2010 年禽流感 H5 亞型及 H7 亞型不活化疫苗檢驗

表 2、2005 至 2010 年 H5 亞型禽流感不活化疫苗檢驗 HI 力價

送檢年度	亞型	疫苗 批號	HI 結果					
			3 週血清力價 (隻數)	超過 16 倍 (%)	超過 32 倍 (%)	4 週血清力價 (隻數)	超過 16 倍 (%)	超過 32 倍 (%)
2005	H5N2	5111974	32 (4)	100	100	—	—	—
			64 (6)					
		5111975	2 (2)	70	70	8 (1)	90	90
			8 (1) 64 (7)					
		5111976	16 (1)	100	90	—	—	—
			64 (9)					
		5111977	2 (1)	90	80	—	—	—
			16 (1) 64 (8)					
		5111978	4 (2)	80	80	—	—	—
			64 (8)					
		5111979	2 (3)	40	30	64 (10)	100	100
			4 (1) 8 (2) 16 (1) 32 (2) 64 (1)					
		5111980	8 (1)	90	80	—	—	—
			16 (1) 64 (8)					
		5111981	64 (10)	100	100	—	—	—
A298A02								
2007	H5N2	7111910	64 (10)	100	100	—	—	—
		H5N9	F42972	2 (1)	90	90	—	—
F42955	64 (9)							
2008	H5N9	F42956	4 (1)	100	100	—	—	—
		F46467	64 (10)					
2010	H5N2	10111901	64 (10)	100	100	—	—	—
			10111902					

表 3、2005 至 2010 年 H7 亞型禽流感不活化疫苗檢驗 HI 力價

送檢年度	亞型	疫苗 批號	HI 結果					
			3 週血清力 價(隻數)	超過 16 倍 (%)	超過 32 倍 (%)	4 週血清力 價(隻數)	超過 16 倍 (%)	超過 32 倍 (%)
2005	H7N1	HP01300	2 (2)			32 (1)		
			8 (1)			64 (9)		
			16 (2)	70	50		100	100
			32 (1) 64 (4)					
		HP01400	2 (2)			8 (1)		
			8 (2)	60	20	16 (1)	90	80
			16 (4)			32 (1)		
			64 (2)			64 (7)		
		HP01500	2 (3)			4 (1)		
			8 (2)	50	30	32 (2)	90	90
			16 (2)			64 (7)		
			32 (1) 64 (2)					
		HP01600	2 (4)			64 (10)		
			8 (1)					
			16 (1)	50	40		100	100
			32 (2) 64 (2)					
		HP01700	2 (1)			32 (1)		
			8 (2)	70	70	64 (9)	100	100
32 (2)								
64 (5)								
H7N3	L188734	8 (2)			64 (10)			
		16 (1)	80	70		100	100	
		32 (7)						
H7N3	L188735	16 (1)	100	90	—	—	—	
		64 (9)						
2007	H7N1	05921302	64 (10)	100	100	—	—	—
		09531505	64 (10)	100	100	—	—	—
		H7N3	6FCH0151	32 (1)			—	—
64 (9)	100			100				
H7N3	L226174	64 (10)	100	100	—	—	—	
		2008	H7N3	F46468	2 (1)			2 (1)
4 (1)						16 (1)		
8 (1)	70				60	32 (1)	90	80
16 (1)						64 (7)		
64 (6)								
2010	H7N3	F50135	64 (10)	100	100	—	—	—

參考文獻

1. 中華人民共和國獸藥典。中國獸藥典委員會。2005。
2. 李淑慧。特殊生物安全實驗室設施及設備與安全防護。生物安全官教育訓練研習會。2010。
3. 動物用生物學的製劑基準。鳥インフルエンザ(油性アジュバント加)不活化ワクチン。農林水産省動物医薬品検査所,平成19年1月15日一部改正告示第36号。
4. 郭軍、陳艷。中國新聞網報導：廣東檢驗檢疫局嚴防禽流感 確保活禽安全供港澳。2010。In：<http://www.takungpao.com/society/news/2010-11-23/146813.html>
5. 陳麗璇。赴美研習反向遺傳技術 (Reverse genetics)心得報告。行政院農業委員會家畜衛生試驗所學術研討專訊2：21~22。2008。
6. 鄭明珠。禽流感特別報導：動物用禽流感疫苗開發趨勢。農業生技產業季刊第六期，2006。
7. ASEAN Standards For Anamal Vaccine. Second Edition. ASEAN Cooperation in Food, Agriculture and Forestry. 2009.
8. Daprile P.N. Current situation of avian influenza in Italy and approaches to its control. In: Acute Virus Infection of poultry. Edited by McFerran J.B. and McNulty M.S, eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 29-35, 1986.
9. Elsken Lawrence. Taiwan and USA Joint Conference on Avian Influenza Prevention and Control : Avian Influenza Vaccine Requirements, 97-125, 2008.
10. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. 2008.
11. Garcia A., Crawford J.M., Latimer J.W., Rivera-Cruz E., Perdue M.L. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J Gen Virol, 77, 1493-1504, 1996.
12. Naeem K. The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. U.S. Animal Health Association, 31-35, 1998.
13. Office International Des Epizooties(OIE). AVIAN INFLUENZA. In : Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals. Chapter 2.3.4, 2009.
14. Sims L.D. Avian influenza in Hong Kong. Proceeding of the Fifth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA, 14-17 April 2002. Avian Dis 47:832-838, 2003.
15. Wood J.M., Kawaoka Y., Newberry L.A., Bordwell E., Webster R.G. Standardisation of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. Avian Dis 29:867-872, 1985.

Inspection of Avian Influenza Inactivated Vaccine of H5 and H7 Subtypes between 2005 and 2010

BY Chen*, CT Lin, HC Huang, SR Yeh, RS Chen

Animal Drugs Inspection Branch,

Animal Health Research Institute, COA, Executive Yuan

Abstract According to government disease-control policy for avian influenza, the animal drug inspection branch is responsible for executing inspections of avian influenza inactivated vaccines derived from H5 and H7 subtypes. Between 2005 and 2010, 17 batch vaccines of H5 subtype and 13 batches of H7 subtype were inspected, including characteristics, sterility, preservative content, safety, HI titer and virus inactivation conformed to the required standards. In which, the HI titer were considered to be the most important in determining vaccine performance. These were evaluated using regulations of USDA-APHIS-VS-CVB as a comparative template. Based on our results, we found, if we used the USDA-APHIS-VS-CVB standard- a HI titer of 32x of 80 % vaccinated chickens (rather than the 16x standard), the percentage of tested vaccine batches reaching standard titers was altered. We found that only 70 % (21/30) reached standard titers at 3 weeks after vaccination, and the remaining 30 % (9/30) did not induce HI titer responses conforming to standard (32x) until 4 weeks after vaccination.

Keywords: *Avian influenza, Inactivated vaccine, Titer test*