家畜衛試所研報 No.48：11~20 (2013)

口蹄疫不活化疫苗國家檢驗報告

林琇蘋[2*]、李璠[1]、胡書佳[1]、曾瑤芬[2]、余雪筠[2]、葉修如[2]、陳瑞祥[2]

[1]行政院農業委員會家畜衛生試驗所
[2]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 口蹄疫是偶蹄類動物高度傳染性的疾病，造成嚴重的經濟及社會損失。本研究描述 2008 年至 2013 年輸入口蹄疫不活化疫苗 35 批之國家檢驗結果進行統計與分析。該等疫苗皆為 O 血清型，包括 O-Taiwan、O-Manisa 或 O-Campos 三種病毒株，其國家檢驗不合格率為 5.7%。為瞭解疫苗免疫後豬隻血清中和抗體與對 O/TW/YunLin/2009 病毒株之保護力相關性，另取 10 批疫苗免疫後之豬隻於免疫後 28 天再以 O/TW/YunLin/2009 病毒株進行攻毒。結果 10 批中有 6 批血清幾何平均中和抗體力價大於 32 倍者（我國國家檢驗標準），其對 O/TW/YunLin/2009 病毒株攻毒後保護力為 80%至 100%（世界動物衛生組織標準攻毒後保護力 12/16，>75%）； 4 批血清幾何平均中和抗體力價小於 32 倍者，保護力只有 0%至 60%，此數據顯示我國國家檢驗標準使用血清中和抗體幾何平均力價判定結果與世界動物衛生組織標準之判定結果相似，且不論同源性或異源性疫苗免疫後以 O/TW/YunLin/2009 病毒株進行攻毒，高於抗體切割點之攻毒後保護力皆明顯高於低於抗體切割點之攻毒後保護力。

關鍵字：口蹄疫、國家檢驗、不活化疫苗、中和力價、保護力。

緒言

口蹄疫為高度傳染性的病毒性疾病，易感族群包括牛、豬、綿羊、山羊等偶蹄類動物，感染動物於口腔黏膜、鼻吻部、趾間、蹄冠部及乳頭會出現水疱病變。口蹄疫病毒（Foot-and-mouth disease virus）為RNA病毒，屬於小核醣核酸病毒科（Picornaviridae）的口瘡病毒屬（Aphthovirus），其血清型共有7型，包括O、A、C、亞洲1型（Asia 1）、南非1型（SAT 1）、南非2型（SAT 2）及南非3型（SAT 3），各血清型之間不具交叉保護力[3]。

臺灣於86年爆發親豬型口蹄疫疫情，該波疫情約有100萬頭豬隻確診案例，造成約400萬頭豬隻遭到撲殺，嚴重影響臺灣畜牧產業[4,8,9]。行政院農業委員會於同年制定「清除豬瘟暨口蹄疫所需疫苗之種類及其管理辦法」，全面推行施打口蹄疫不活化疫苗政策，直至102年為止，僅有少數零星爆發案例發生[7]。

本分所依據動物用藥品管理法及動物用藥品檢驗標準執行本疫苗之檢驗，本報告統計97年至102年5月受理之口蹄疫不活化疫苗檢驗結果及批數等資料以及檢驗後豬隻以O/TW/YunLin/2009病毒株攻毒試驗結果。

材料與方法

試驗疫苗

為97年至102年5月受理之輸入口蹄疫不活化

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

家畜衛試所研報 No.48：11~20 (2013)

疫苗，共計35批。

特性試驗

觀察待測疫苗之理學性狀，是否為均勻懸浮液。

無菌試驗

以無菌接種環沾取小量疫苗分別塗抹於硫酸乙醇酸鹽（Thioglycollate）、胰蛋白酵素黃豆瓊脂（Tryptic Soy Agar）及血液培養基，並以枯草桿菌作為陽性對照，以未接種作為陰性對照，於37℃培養箱培養並觀察10日。

病毒基因型別認定試驗

每批待測疫苗先進行反轉錄聚合酵素連鎖反應（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction；RT-PCR），增幅出196 bp大小之口蹄疫病毒核酸片段後，再依口蹄疫基因型別檢測套組（FMDV O Type Chip）進行基因型別檢測。

防腐劑含量試驗

一、甲醛（Formaldehyde）取待測疫苗1 mL、10％氯化鈉2mL及氯仿3mL充分混合均勻，以3,000 rpm離心15 分鐘後取上層1 mL再加去離子水4 mL，即完成待測疫苗前處理。取前處理後之待測疫苗0.1 mL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，混合均勻後置於60℃水浴槽感作15分鐘，再放置於4℃冷水中5分鐘，置於室溫20分鐘，最後取2 mL溶液置於比色管內，以分光光度計410 nm波長測定吸光值。

二、酚（Phenol）取待測疫苗1 mL至褐色定量瓶中，以四氫呋喃定量至標線後倒入50 mL離心管中，以9,000 rpm離心20分鐘，抽取上清液以0.45μm過濾膜過濾，以高效能液相層析儀（Waters 2695 Separations Model）進行含量檢測。

三、柳硫汞（Thimerosal） 取待測疫苗6 mL加入二氯甲烷6 mL，再加6 mL去離子水溶液混合均勻，以9,000 rpm離心30分鐘，經離心後之樣品分為水層及二氯甲烷層，以玻璃滴管吸取離心後之上澄清液至20 mL褐色定量瓶，離心管中剩餘之二氯甲烷層再加入6 mL之10％氯化鈉水溶液，再以9,000 rpm離心30分鐘進行第二次萃取，最後以玻璃滴管吸取離心後之上澄清液與第一次萃取之上澄清液放至同一20 mL褐色定量瓶中，最後以去離子水定量至定量線，以0.45 μm過濾膜過濾，以高效能液相層析儀（Waters 2695 Separations Model）進行含量檢測。

安全試驗

一、小鼠：每批待測疫苗使用體重13至15公克之小鼠5隻，皮下注射本劑0.2 mL，觀察7日。

二、天竺鼠：每批待測疫苗使用選體重250至300公克之天竺鼠2隻，以皮下注射本劑0.6 mL，觀察7日。

三、小豬：每批待測疫苗使用8至12週齡口蹄疫抗體陰性小豬4頭，任選1頭於耳根後肌肉注射本劑2劑量，另選1頭分別以0.5公撮注射於左前腳之蹄冠部，剩餘2頭與之同居飼養，觀察10日。

效力試驗

一、**中和試驗** 每批待測疫苗使用8至12週齡口蹄疫抗體陰性小豬7頭，任選5頭於耳根後各肌肉注射本劑1劑量，另2頭為對照，於本劑注射後21天採血，測定中和抗體，以100 $TCID_{50}$之O/ TW / ZhuBei /97病毒液等量混合，於37℃含5%二氧化碳的恆溫培養箱感作1小時，再加入100μL之BHK-21細胞液，培養48至72小時後觀察CPE結果，依據口蹄疫不活化疫苗檢驗標準疫苗注射豬隻之中和抗體價須80%以上或其幾何平均值達32倍以上，對照須為陰性，方可判定為合格。

二、**攻毒試驗** 自101年3月至102年5月，延用上述中和試驗21天採血完之豬隻移至家畜衛生試驗所進行攻毒試驗。攻毒方式為免疫後第28天，連同對照組2頭，於豬隻蹄冠部注射$10^5 TCID_{50}$強毒（O/TW/YunLin/2009），經14天之觀察，對照組豬隻均至少有1個蹄出現水泡或潰瘍病灶，免疫豬出現任何口蹄疫症狀即判定為不具保護力。

結果

特性試驗、無菌試驗、病毒基因型別認定試驗、防腐劑含量試驗及安全試驗

統計97年至102年5月，本分所共計執行35批次口蹄疫不活化疫苗檢驗，其特性試驗皆具固有理學性狀，無異物及異常氣味；無菌試驗皆無發現可被檢出之活菌；病毒基因型別認定試驗皆未檢出原標籤以外之病毒株；防腐劑含量試驗皆符合甲醛及酚之含量為0.5%以下，硫柳汞之含量為0.01%以下；安全試驗免疫過之小鼠、天竺鼠及小豬，觀察7或10日後皆無任何不良反應而健存，以上各項結果皆符合檢驗標準規定。

疫苗病毒株及劑量統計

97年至102年5月執行之口蹄疫不活化疫苗檢驗共計35批次，平均每年檢驗5.7±2.99批次。以病毒株型別分類，以O-Taiwan型別病毒株疫苗佔最大數（26批次，74%），其次為O-Manisa型別病毒株疫苗（8批，23%），最後為O-Campos型別病毒株疫苗（1批次，3%）（圖1）；以年度分類，99年送驗批數最多（11批次，31%），其次為97年度（7批次，20%），整體不合格率約為5.7%（2/35）（圖2），該2批次不合格疫苗均為102年之檢驗件，係因效力試驗之血清中和抗體幾何平均值未達32倍以上，故判定為不合格；以劑量而言，年平均送驗劑量為7,615,818±2,950,432劑量，其中99年度送驗12,731,270劑量居冠，101年度送驗9,083,000劑量位居第二（圖3）。

效力試驗

一、**中和試驗結果與攻毒後結果比較** 本試驗自101年3月至102年5月將口蹄疫不活化疫苗中和試驗檢驗後之豬隻移至家畜衛生試驗所進行後續攻毒試驗，結果10批次檢驗豬隻（含重覆檢驗2批次）中，以3週血清中和抗體幾何平均力價及攻毒結果進行比較，有3批次血清中和抗體幾何平均力價高於32倍且攻毒後檢驗豬隻全部未發病（表1疫苗編號1、2、4）；3批次血清中和抗體幾何平均力價高於32倍且攻毒後80%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號3、5、8）；1批次血清中和抗體幾何平均力價低於32倍且攻毒後60%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號6）；1批次血清中和抗體幾何平均力價低於32倍且攻毒後40%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號9）；2批次血清中和抗體幾何平均力價低於32倍且檢驗豬隻全部發病（表1疫苗編號7、10）。以3週血清中和抗體32倍以上豬隻頭數及攻毒結果進行比較，有3批次之5頭豬隻皆具32倍以上血清中和抗體且攻毒後全部檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號1、2、4）；2批次之5頭豬隻具32倍以上血清中和抗體且攻毒後80%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號3、5）；1批次之3頭豬隻具32倍以上血清中和抗體且攻毒後80%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號8）；1批次之1頭豬隻具32倍以上血清中和抗體且攻毒後60%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號6）；1批次之5頭豬隻皆不具32倍以上血清中和抗體且攻毒後40%檢驗豬隻未發病（表1疫苗編號9）；2批次之5頭豬隻皆不具32倍以上血清中和抗體且攻毒後全部檢驗豬隻皆發病（表1疫苗編號7、10）（表1）。

二、**不同血清倍數抗體與O/TW/YunLin/2009病毒株攻毒保護力之比較** 本試驗共85個檢體（含同源性疫苗O-Taiwan與異源性疫苗O-Manisa），若以中和抗體力價4倍作為抗體切割點，低於中和抗體力價4倍豬隻攻毒後保護力為7%(2/28)，高於中和抗體力價4倍豬隻攻毒後保護力為61%（35/57），血清抗體4倍以上較血清抗體4倍以下攻毒保護力高，且具統計學上顯著差異（$p<0.05$）；若以中和抗體力價32倍作為抗體切割點，低於中和抗體力價32倍豬隻攻毒後保護力為16%（7/43），高於中和抗體力價32倍豬隻攻毒後保護力為71%（30/42），血清抗體32倍以上較血清抗體32倍以下攻毒保護力高，且具統計學上顯著差異（$p<0.05$）；若以中和抗體力價256倍作為抗體切割點，低於中和抗體力價256倍豬隻攻毒後保護力為35%（22/68），高於中和抗體力價256倍豬隻攻

毒後保護力為76%（13/17），血清抗體256倍以上較血清抗體256倍以下攻毒保護力高，且具統計學上顯著差異（$p<0.05$）。綜合以上，顯示中和抗體不論抗體切割點落於幾倍中和抗體，其高於抗體切割點之攻毒後保護力皆明顯高於低於抗體切割點之攻毒後保護力（表2），此與分別將同源性疫苗及異源性疫苗進行不同血清倍數抗體與保護力之比較，雖然樣本數較低，但結果一致（表3及表4）。

討論

97年至102年口蹄疫不活化疫苗35批之特性試驗、無菌試驗、病毒基因型別認定試驗、防腐劑含量試驗及安全試驗結果皆符合我國動物用藥品檢驗標準第72節，顯示疫苗品質及安全性良好。

我國口蹄疫不活化疫苗檢驗標準中，效力試驗以檢測血清中和抗體為主，若有特殊需求則可進行攻毒試驗測定每劑量疫苗之PD_{50}（50% protective dose），其中和抗體之判定標準為「疫苗注射豬隻之中和抗體價須80%以上或其幾何平均值達到32倍以上且不得含有特定血清型以外之抗體，對照須為陰性。」；東南亞國協之口蹄疫不活化疫苗檢驗標準以攻毒為主，但其免疫豬隻頭數僅5頭，判定標準為免疫豬需有60%以上攻毒後不發病；世界動物衛生組織陸生動物診斷試驗及疫苗手冊內關於口蹄疫不活化疫苗效力試驗，除了測定每劑量疫苗之PD_{50}以外，另一方法為測定 PGP（protection against generalised foot infection），其方式為使用16頭豬隻免疫後進行攻毒，判定標準為免疫豬需有75%以上攻毒後不發病[6]。以本研究結果而論，我國血清中和抗體幾何平均值達到32倍以上合格批數與世界動物衛生組織標準免疫豬需有75%以上攻毒後不發病批數較為一致。

在不同血清倍數抗體與保護力之比較方面，有研究顯示豬隻血清抗體與免疫程度有密切之相關性，且中和抗體價及ELISA抗體皆與保護力呈正相關[5]。另有研究更進一步指出雖然血清中和抗體與保護力有顯著之相關性，但有些高中和抗體的豬隻攻毒後仍會發病，且中和抗體越高，保護力越好[2]。本研究結果與上述研究結果相似，顯示以群體免疫效果而論，中和抗體不論抗體切割點落於幾倍中和抗體，其高於抗體切割點之攻毒後以O/TW/YunLin/2009病毒株攻毒保護力皆明顯高於低於抗體切割點之攻毒後保護力。

又本研究發現O/TW/YunLin/2009病毒株對異源性疫苗之中和抗體之合格率偏低，其免疫豬隻攻毒後防禦力亦然，此部份可能與異源性疫苗產生之抗體不同或是異源性疫苗所含之抗原量多寡有關。

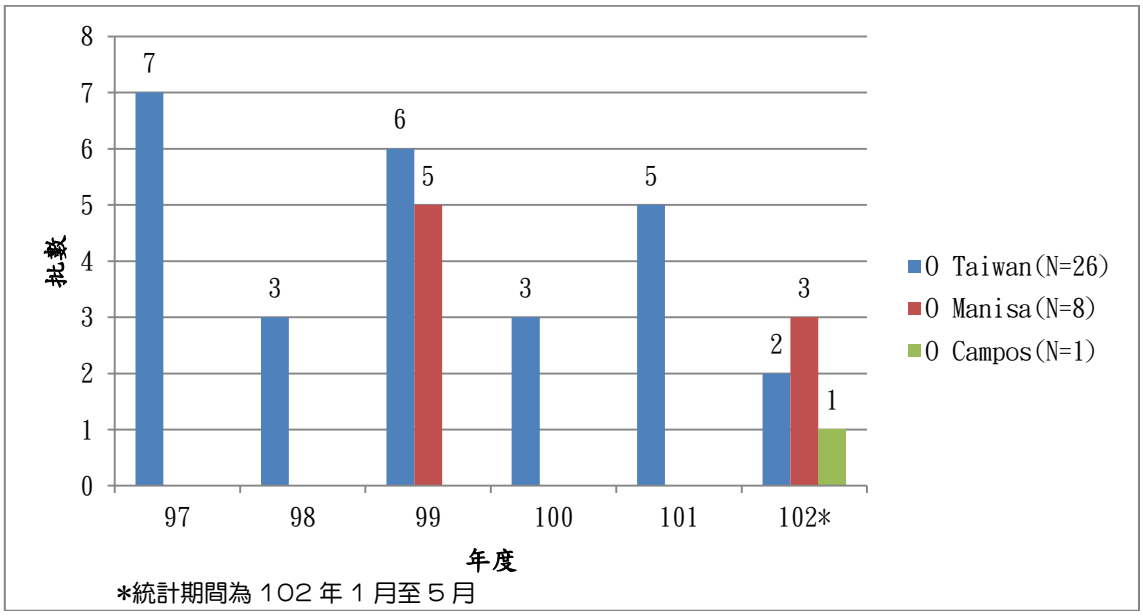

圖 1、97 至 102 年 5 月口蹄疫不活化疫苗不同型別病毒株疫苗檢驗批數圖。

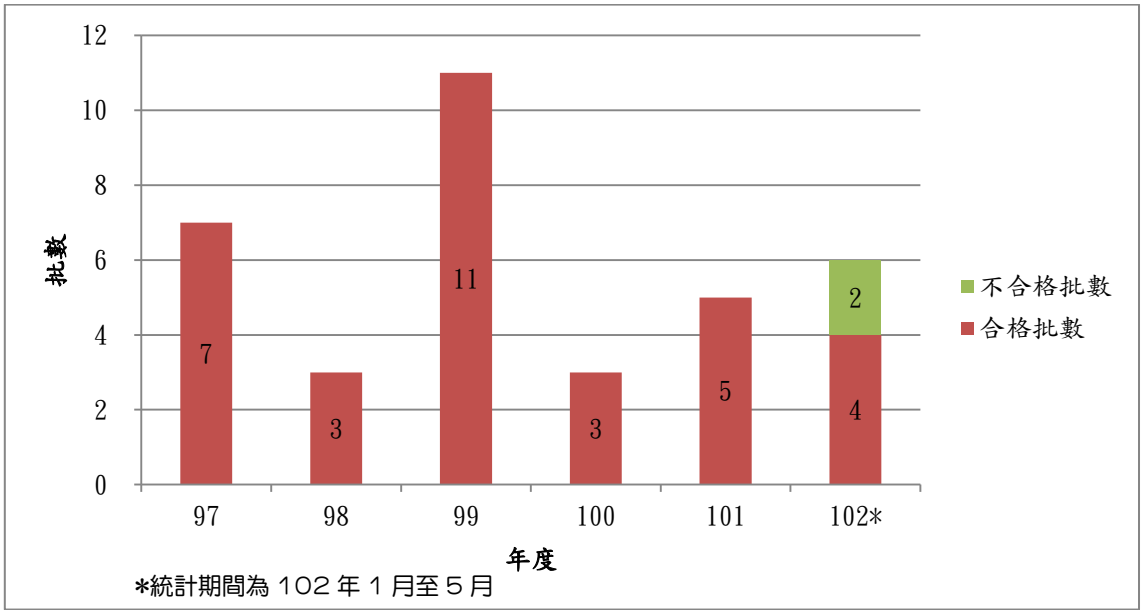

圖 2、97 至 102 年 5 月口蹄疫不活化疫苗合格及不合格檢驗批數圖。

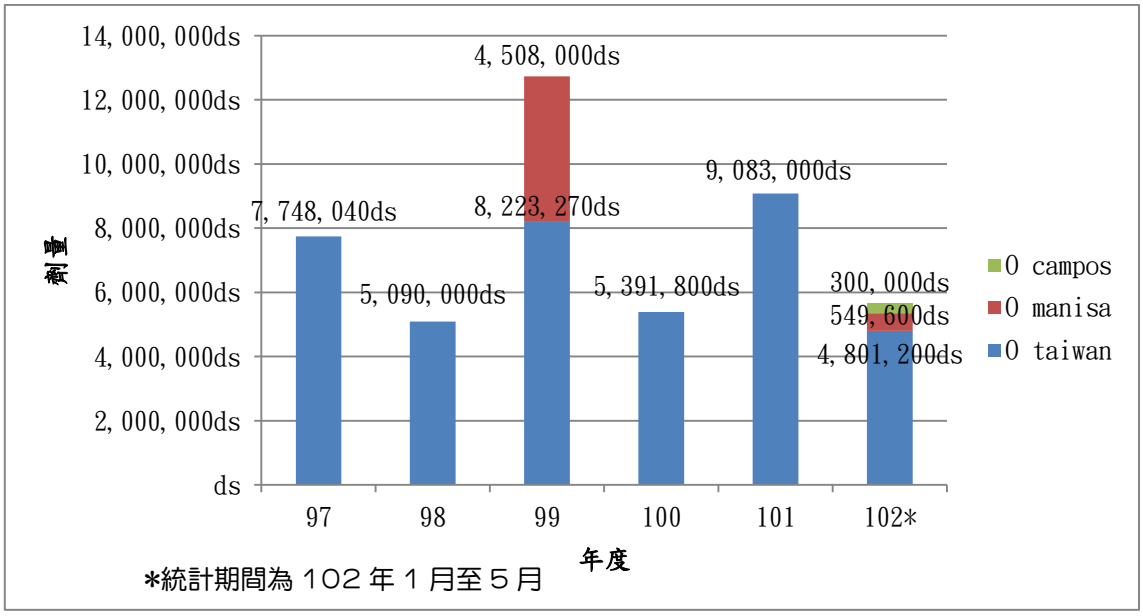

圖 3、97 至 102 年 5 月口蹄疫不活化疫苗年度送驗劑量圖。

表 1、10 批檢驗豬隻（含重覆檢驗 2 批次）3 週血清中和抗體與 4 週以 O/TW/YunLin/2009 病毒株攻毒試驗結果。

疫苗編號	3 週血清中和抗體		判定	4 週攻毒試驗
	幾何平均值	32 倍以上頭數		肌肉注射免疫 1 劑量後耐過攻毒頭數
1	256.0	5/5	合格	5/5
2	274.4	5/5	合格	5/5
3	294.0	5/5	合格	4/5
4	256.0	5/5	合格	5/5
5	128.0	5/5	合格	4/5
6	9.0	1/5	不合格	3/5
7	4.4	0/5	不合格	0/5
8	36.8	3/5	合格	4/5
9	6.6	0/5	不合格	2/5
10	4.8	0/5	不合格	0/5

*編號 1 至 5 為同源性疫苗（O-Taiwan），編號 6 至 10 為異源性疫苗（O-Manisa）

表 2、85 個檢體（含同源性疫苗 O-Taiwan 與異源性疫苗 O-Manisa）不同血清倍數抗體切割點對 O/TW/YunLin/2009 保護力之比較。

	<抗體切割力價		≧抗體切割力價		
抗體切割力價	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	p 值
4 倍	2/28	7%	35/57	61%	2.32E-06
8 倍	3/33	9%	34/52	65%	3.76E-07
16 倍	5/40	13%	32/45	71%	6.04E-08
32 倍	7/43	16%	30/42	71%	3.28E-07
64 倍	9/47	19%	28/38	74%	5.12E-07
128 倍	15/57	26%	22/28	79%	5.39E-06
256 倍	24/68	35%	13/17	76%	0.00227

表 3、同源性疫苗 O-Taiwan 不同血清倍數抗體切割點對 O/TW/YunLin/2009 保護力之比較(N=48）。

	<抗體切割力價		≧抗體切割力價		
抗體切割力價	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	p 值
4 倍	0/12	0%	26/36	72%	1.69E-05
64 倍	1/15	7%	25/33	76%	1.06E-05
128 倍	4/20	20%	22/28	79%	7.1E-05
256 倍	13/31	42%	13/17	76%	0.022669
512 倍	25/44	57%	3/4	75%	0.465571

表 4、異源性疫苗 O-Manisa 不同血清倍數抗體切割點對 O/TW/YunLin/2009 保護力之比較(N=37）。

	<抗體切割力價		≧抗體切割力價		
抗體切割力價	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	攻毒後耐過隻數/所有隻數	保護率	p 值
4 倍	2/16	13%	9/21	43%	0.045533
8 倍	3/21	14%	8/16	50%	0.018796
16 倍	5/28	18%	6/9	67%	0.005466
32 倍	7/31	23%	4/6	67%	0.030831
64 倍	8/32	25%	3/5	60%	0.110659

家畜衛試所研報 No.48：11~20 (2013)

參考文獻

1. 動物用藥品檢驗標準。行政院農業委員會公告。In: http://law.coa.gov.tw
2. Black L, Francis MJ, Rweyemamu MM, Umebara O, Boge A. The relationship between serum antibody titre and protection from foot and mouth disease in pigs after oil emulsion vaccination. J Biol Stand 12(4): 379-389, 1984.
3. Chu RM, Yang PC, Cheng IC. Review: Foot-and-mouth disease. J Chin Soc Vet Sci 23: 477-491, 1997.
4. Dunn CS, Donaldson AI. Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. Vet Rec 141: 174-175, 1997.
5. Flachsel P et al., A study of the level of immunity against FMD in pigs using the indirect ELISA test. De La XVIeme Conference de La Commission permenente de La fievre aphteuse de L' O.I.E. Paris. 1982.
6. Foot and mouth disease. In: OIE terrestrial manual. Chapter 2.1.5, 2012.
7. Lin YL, Jong MH, Huang CC, Shieh HK, Chang PC. Genetic and antigenic characterization of foot-and-mouth disease viruses isolated in Taiwan between 1998 and 2009. Vet Microbiol 145(1-2): 34-40, 2010.
8. Shieh HK. The FMD situation in Taiwan. J Chin Vet Sci 23: 395-402, 1997.
9. Yang PC, Chu RM, Chung WB, Sung HT. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. Vet Rec 145: 931-734, 1999.

Exp.Rep AHRI.,No.48：11~20 (2013)

National Assay Report of the Food-and-Mouth Disease Inactivated Vaccine

HP Lin[2*], F Lee[1], SC Hu[1], YF Tseng[2], HY Yu[2], SR Yeh[2], RS Chen[2]

[1]Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan
[2]Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Foot-and-mouth disease is a highly contagious animal disease that results in severe economic losses in Taiwan and throughout the world. This study describes nationwide assays on 35 batches of imported foot-and-mouth disease inactivated vaccines from 2008 to 2013. All the vaccines were O serotype, composed of either O-Taiwan, O-Manisa or O-Campos strains. The fail rate of the 35 batches in passing the potency test was 5.8%. In order to understand the relationship between serum neutralizing antibody titers and protection, pigs vaccinated with 10 batches of these vaccines were challenged at 28 days post immunization. Results showed that only 6 of the 10 batches of vaccine could induce neutralizing antibody titers higher than 32 × (our national assay standard) with protection rate >75% (12/16 protection rate, OIE standards). Pigs vaccinated with 4 out of 10 batches had neutralizing antibody titers lower than 32× and only 0% to 60% protection rates. In conclusion, results of the potency test using our national assay standard were similar to those of the OIE standard. The higher neutralizing antibody titers corresponded to the higher protection rates.

Keyword: *foot-and-mouth disease, national assay, inactivated vaccine, neutralizing antibody titer, protection.*

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute

Exp.Rep AHRI.,No.48：11~20 (2013)