

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

林俊達*、柯依廷、蔡任桓、陳炳義、葉修如、李淑慧

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 臺灣水產養殖業魚種眾多，多屬溫水魚種，如石斑、烏魚、吳郭魚及鱸魚等，業者養殖技術優良，但疫病問題亦造成嚴重經濟損失，目前皆以抗生素及化學藥品控制疾病，然疫病之防疫應以預防免疫取代藥物給予，以減少民眾食安疑慮。目前我國水產疫苗檢驗標準共計有 2 種，疫苗病原種類包含石斑魚虹彩病毒 (Grouper iridovirus) 及瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*)，國內研發水產疫苗相關學術機構及研究單位眾多，此報告彙整並比較鄰近國家日本之水產疫苗檢驗標準共計有 22 種，其疫苗給予方式包含浸泡方式、經口投予、肌肉注射及腹腔注射等，疫苗病原種類包含真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus)、神經壞死病毒 (Nervous necrosis virus)、格式乳酸球菌 (*Lactococcus garvieae*)、瓶鼻海豚鏈球菌、無乳鏈球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)、鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、發光桿菌 (*Photobacterium damsela subsp. piscicida*) 及愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 等，於相同疫苗病原，但對象魚種不同時，其效力試驗判定方法及標準亦不相同，非一體適用，此篇報告除可提供水產疫苗檢驗標準制訂時參考，亦可供國內產學研單位於水產製劑研發及試驗參考使用。

關鍵詞：水產養殖、魚用疫苗、檢驗標準

緒言

近年來國人逐漸關注相關畜禽水產品品質及用藥狀況，食安問題演變成臺灣重大議題，一直以來臺灣水產品品質備受國際好評。臺灣養殖產業單位面積飼養密度高，養殖區域趨於集中，高密度飼養環境下容易導致罹病率增加，養殖業易受到病毒性與細菌性疾病困擾，主要包含虹彩病毒、神經壞死病毒、弧菌及鏈球菌等，導致魚苗大量損失，影響養殖業者生計。目前國內已上市之水產疫苗包含有行政院農業委員會家畜衛生試驗所自行研發上市的石斑魚虹彩病毒不活化疫苗及國外輸入之金目鱸瓶鼻海豚鏈球菌不活化疫苗，現行國內許多研究機構、大學院校與生技產業等皆致力於研究水產疫苗研究，已經有許多水產團隊組成，此外亦有國外疫苗廠商評估我國市場，向中央主管機關申請檢驗登記；參考日本的經驗，水產疫苗使

用可大幅減少因疫病而需投與之抗菌藥品，相信後續我國仍有許多水產相關製劑產品會上市嘉惠水產養殖業，提升魚體免疫力，減少化學藥劑使用，亦保障民眾食的安全。因此各類水產疫苗檢驗技術建立、檢驗標準評估及檢驗設備適用性等皆為將來面臨到之問題。鄰近我國的日本目前水產疫苗檢驗標準共計有 22 種，疫苗檢驗之對象魚種包含了真鯛、七帶石斑、香魚、虹鱒、比目魚、青甘鰺及紅甘鰺等魚種，雖與我國大宗飼養魚種種類有些差異，但其疫苗檢驗中相關安全試驗及效力試驗執行方式，亦可提供我國水產疫苗研發團隊參考，並可做為將來水產疫苗登記時田間試驗及檢驗標準制訂之參考模式，以因應未來國內水產魚用疫苗登記所需。

材料與方法

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

水產動物疫苗之檢驗不論國內或國外，主要皆為了確認疫苗本身品質、安全性及是否能符合其所宣稱之保護力而進行評估檢驗，檢驗項目主要包含一般試驗及動物試驗，一般試驗項目包含有特性試驗、無菌試驗、防腐劑試驗、認定試驗、pH值測定等，動物試驗項目則包含有安全試驗、效力試驗及力價試驗等，以下就我國與日本水產疫苗檢驗相關資訊做說明。

我國水產疫苗檢驗標準

依據我國動物用藥品檢驗標準[3]，目前我國水產疫苗檢驗標準共計有兩節，分別為第86節石斑魚虹彩病毒不活化疫苗檢驗標準及第94節金目鱸瓶鼻海豚鏈球菌不活化疫苗檢驗標準，石斑魚虹彩病毒不活化疫苗主要免疫對象魚種為石斑（包含龍膽石斑及點帶石斑），而金目鱸瓶鼻海豚鏈球菌不活化疫苗免疫對象魚種為金目鱸。各節檢驗標準檢驗內容簡述如下：

一、依據第86節石斑魚虹彩病毒不活化疫苗檢驗標準，第182-12條說明被檢石斑魚虹彩病毒（Grouper iridovirus）不活化疫苗應符合下列條件：

- (1) 特性試驗：須具固有理學之性狀，且無異物及異常氣味。
- (2) 無菌試驗：不得含有任何可能檢出之活菌。
- (3) 防腐劑含有量試驗：甲醛(Formaldehyde) 含有量須為 0.2% 以下，硫柳汞(Thimerosal) 須為0.01%以下。
- (4) 安全試驗：選體重約10至20公克無虹彩病毒感染石斑魚130尾，停止給餌24小時後，將其分成3組，10尾腹腔注射2劑量疫苗，60尾腹腔注射1劑量疫苗2次，每次間隔2週，其餘60尾腹腔注射0.1mL磷酸緩衝液（PBS）做為對照，疫苗接種後於攝氏22至26度水溫及循環式環境飼育觀察2週，需無任何不良反應而健存。對照組若未進行試驗前死亡率高於10%，應予複檢。
- (5) 效力試驗：將石斑魚虹彩病毒強毒原株（master seed）繼代培養在2代以內，種毒（working seed）在3代以內，進行10

倍稀釋，預測對照組之死亡率為80%之稀釋，將該80%之稀釋和其前後之稀釋（共有3階段稀釋）做為攻毒液。於第2次注射後4週，停止給餌24小時後，將前款安全試驗接種1劑量疫苗之60尾石斑魚及60尾對照組各分成3組（每組20尾），每尾分別腹腔注射0.1mL各階段攻毒液，觀察3週，對照組有60%以上死亡率時，免疫組的存活率至少要有1階段須比對照組存活率高40%。

二、依據第94節金目鱸瓶鼻海豚鏈球菌不活化疫苗檢驗標準，第182-28條內容說明被檢金目鱸瓶鼻海豚鏈球菌（*Streptococcus iniae*）不活化疫苗須符合下列條件：

- (1) 特性試驗：須具固有理學之性狀，且無異物及異常氣味。
- (2) 無菌試驗：不得含有任何可能檢出之活菌。
- (3) 防腐劑含有量試驗：甲醛(Formaldehyde) 含有量須0.2%以下，硫柳汞(Thimerosal) 須為0.01%以下。
- (4) 安全試驗：選體重20至40公克無臨床症狀、肉眼病灶及瓶鼻海豚鏈球菌感染之健康金目鱸魚苗50尾，在停止給餌24小時後，將其分成3組，10尾腹腔注射2劑量菌苗，20尾腹腔注射1劑量，其餘20尾腹腔注射0.1mL磷酸緩衝液（Phosphate buffered saline, PBS）做為對照，菌苗接種後於攝氏26至30度水溫及循環式環境飼育觀察2週，觀察期間免疫組魚隻應無異常症狀且至少須90%以上健存。對照組未進行試驗前死亡率高於10%者，應予複檢。
- (5) 效力試驗：將瓶鼻海豚鏈球菌攻毒菌液以磷酸緩衝液進行稀釋，以預計對照組死亡率80%以上之稀釋菌液做為攻毒菌液，於菌苗注射後2週，停止給餌24小時後，將前款安全試驗接種1劑量菌苗之免疫組及對照組，每尾分別腹腔注射0.1毫升攻毒

菌液，觀察2週，對照組有60%以上死亡率，免疫組的相對存活率（ $1 - (\text{免疫組死亡率} / \text{對照組死亡率}) \times 100\%$ ）須超過60%。

日本水產疫苗檢驗標準

依據日本動物用生物學的製劑檢定基準[4]及水產用醫藥品之使用報告[2]，日本水產疫苗檢驗標準明細如表1，包含各類疫苗使用抗原種類、疫苗檢驗所用之魚種及疫苗可施打之魚種等。細分疫苗種類分別彙整出各疫苗安全試驗方法及判定、效力試驗動物免疫方法、效力攻毒菌株及稀釋方法以及效力試驗方法與判定等如表2至表7。目前日本已核准上市之水產疫苗皆為不活化疫苗，可依其疫苗劑型、佐劑種類、抗原種類、免疫方式等予以區分，依疫苗劑型可分成單價疫苗（Monovalent vaccine）、雙價疫苗（Bivalent vaccine）、三價疫苗（Trivalent vaccine）及四價疫苗（Quadrivalent vaccine）等，依佐劑有無及種類區分主要分成無佐劑（Non-adjuvant）、油質佐劑（Oil adjuvant）及褐藻醣膠（Fucoidan adjuvant）等，依其疫苗免疫方式，則有浸泡免疫、口服投予、腹腔注射及肌肉注射等方式。

結果

日本早期開始發展水產疫苗，在1988年研發上市香魚及虹鱒浸泡免疫用之弧菌症不活化疫苗，為日本第一個核准上市之水產疫苗，續於1990年上市青甘鱒格式乳酸球菌症不活化口服疫苗及真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗，1997年上市注射型格式乳酸球菌症不活化疫苗，2000年開始有油質佐劑疫苗及多價疫苗研發上市，包含2004年上市比目魚鏈球菌症不活化疫苗、2008年上市發光桿菌症不活化疫苗、2010年上市紅甘鱒無乳鏈球菌症不活化疫苗，至2013年比目魚的愛德華氏病不活化疫苗研發上市。在日本以水產疫苗免疫方式防治病毒性及細菌性疾病效果良好，以青甘鱒乳酸球菌感染症模式為例，此病症從1990年起病例數開始增加，在1998年其格式乳酸球菌感染症發生率達到53.2%高峰，為治療此細菌感染症其巨環類抗生素（Macrolide）之使用量

便大幅攀升，然抗生素使用量之增加並未顯著減少此感染症之病例數，直至1997年上市注射型格式乳酸球菌症不活化疫苗後，隨著疫苗推廣及施打率提升，到了2000年巨環類抗生素使用量明顯下降，2003年青甘鱒乳酸球菌感染症發生率降至20.9%，2004年巨環類抗生素使用量降到最低。

水產疫苗之檢驗方法建立，會隨著國家不同的防疫政策、疫病傳播方式、抗原之種類、使用對象動物之生物特性，甚至是產品劑型的不同或製造廠商特有的專利技術等，而有不同的檢驗方法。目前我國2種水產疫苗安全試驗評估方式為魚隻腹腔注射免疫2劑量疫苗後觀察2週，需無任何不良反應而健存，效力試驗評估方式為魚隻腹腔注射免疫1劑量疫苗後，再以相對應之強毒株或強菌株進行腹腔注射攻毒，續以觀察免疫組與對照組之存活率差異做為評估指標。日本虹彩病毒疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表2，共計有7種疫苗，免疫方式包含肌肉注射及腹腔注射，效力試驗評估方式包含免疫後強毒株腹腔注射攻毒及ELISA抗體力價測定等方式；日本神經壞死病毒疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表3，主要為腹腔免疫七帶石斑之不活化疫苗，效力試驗評估方式為免疫後採血進行中和抗體力價檢測；日本弧菌疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表4，共計有9種疫苗，免疫方式包含浸泡免疫及腹腔注射，效力試驗評估方式包含免疫後強毒株浸泡攻毒、強毒株腹腔注射攻毒及凝集抗體力價測定等；日本鏈球菌疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表5，共計有15種疫苗，免疫方式包含口服投予、腹腔注射及肌肉注射等，效力試驗評估方式包含免疫後強毒株浸泡攻毒及強毒株腹腔注射攻毒等；日本發光桿菌疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表6，共計有4種疫苗，免疫方式皆為腹腔注射，效力試驗評估方式亦皆為免疫後強毒株腹腔注射攻毒；日本愛德華氏菌疫苗安全試驗及效力試驗評估方式彙整如表7，主要為腹腔免疫比目魚之不活化疫苗，原效力試驗評估方式為免疫後強毒株浸泡攻毒，於107年3月8日修改為免疫後採血進行凝集抗體力價檢測。

以日本弧菌疫苗檢驗方式為例，其多種疫苗抗原

皆為鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*)，但針對不同疫苗其效力評估方式則有免疫後強毒株浸泡攻毒、強毒株腹腔注射攻毒及凝集抗體力價測定等三種不同方式，每一種不同的試驗方法就有不同的實驗動物需要量，試驗所需之時間也各不相同，這都影響檢驗之實驗設計。我國水產魚用疫苗檢驗標準中在一般試驗包含特性試驗、無菌試驗、真空試驗及防腐劑試驗等，除可沿用現行陸生動物之檢驗標準外，在安全試驗及效力試驗等動物試驗，仍須針對臺灣特有魚種及病原，建立其動物試驗平台、檢測方式及標準作業程序。

討論

我國動物用藥品檢驗機關為行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所，日本相對應職掌之檢驗單位為動物醫藥品檢查所，為隸屬於農林水產省 (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, MAFF) 之獨立機關，負責日本國家獸醫藥物製品管理。日本與我國對於動物用生物製劑產品 (包含血清、疫苗及診斷試劑) 皆採取逐批檢驗方式，日本一年針對水產疫苗檢驗批數約為20至25批，為配合當地水產養殖業者魚苗生產及給予疫苗之時節，疫苗廠商大多集中於當年度之1月至6月進行水產疫苗生產，續由動物用醫藥品檢查所進行疫苗檢驗，檢驗後提供於水產養殖業者進行魚隻免疫用，於下半年度基本上各疫苗廠商並不製造水產疫苗，亦無相對應之檢驗業務。我國目前水產疫苗年檢驗量約1至2批，搭配石斑魚苗生產季節進行疫苗製作生產及依據我國動物用藥品檢驗標準進行檢驗後合格放行。

日本疫苗廠商向主管機關申請水產疫苗檢驗登記時，可分別提出此疫苗針對不同對象魚種其安全試驗及效力試驗評估方式及結果，不同對象魚種之間其評估方式及指標並不會完全相同，提出之試驗資料經動物醫藥品檢查所委員會審核通過後即可使用於多項魚種。舉例來說如真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗，此

疫苗可施打之魚種包含真鯛 (Red sea bream)、縱帶鰹 (Striped jack)、馬拉巴石斑 (Malabar grouper)、點帶石斑 (Orange-spotted grouper) 及鰺屬類 (Genus *Seriola*) 魚種等，國家疫苗檢驗所使用之魚種為真鯛，疫苗檢驗內容中其效力試驗評估方式為疫苗免疫後將虹彩病毒強毒株10倍稀釋進行3階段攻毒，其疫苗合格評估指標為當其中1階段對照組死亡率高於60%時，免疫組存活率須比對照組高40%以上，除了疫苗檢驗對象魚種真鯛須符合其疫苗效力試驗評估標準外，其餘魚種在檢驗登記時並不須符合真鯛評估標準而可用其他評估指標取代。

臺灣水產養殖業魚種眾多，且多屬溫水魚種，如石斑、烏魚及鱸魚等，與日本之真鯛、比目魚、鰺魚、香魚以及歐美之冷水性鮭鱒魚等品種不同[4]，疫苗免疫對象魚種便有所差異，如日本瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 不活化疫苗主要免疫對象魚種為比目魚及真鯛，而我國瓶鼻海豚鏈球菌不活化疫苗目前可允許之免疫對象魚種為金目鱸，即使相同水產病原對於不同魚種之間，其病原感受性亦有所差別，且由於他國區域流行之病毒株或菌株仍與本國有所差異，國外欲輸入申請檢驗登記之水產疫苗，若要使用於本國水產養殖產業，是否真能提供足夠之保護效力，仍須以臺灣本土分離株進行效力試驗或其抗體力價測定方式加以評估，但其原廠規之檢測評估方式及各國檢驗標準項目及評估模式，仍可做為我國水產疫苗檢驗標準制訂及檢驗之參考。雖然目前我國僅有兩張水產魚用疫苗之許可證，免疫方式皆為腹腔注射，但目前國內有許多機關學校及生技產業等團隊正積極研發水產疫苗，且因應養殖業者需求研發注射型疫苗外之新劑型，更可提升水產養殖業者使用之意願及其方便性，推廣水產疫苗給予產生主動免疫，大幅減少後續因疫病所須使用之抗生物質及一般藥物，提升消費者食品安全。

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

表 1、日本水產疫苗檢驗標準名稱及其中文翻譯名稱

項次	日本水產疫苗原名	中譯名	疫苗使用抗原	疫苗檢驗所用之魚種	疫苗可施打之魚種
1	イリドウイルス病不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗	真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) Ehime-1/GF14 株或同等認定之毒株	真鯛	真鯛、鯽屬魚類、縱帶鯨、馬拉巴石斑、點帶石斑
2	イリドウイルス病(油性アジュバント加)不活化ワクチン	虹彩病毒感染症不活化疫苗(油性佐劑)	真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus)	青甘鯨	青甘鯨
3	またたウイルス性神経壊死症不活化ワクチン	石斑魚神經壊死病毒不活化疫苗	神經壊死病毒 (Nervous necrosis virus serotype C)	七帶石斑	七帶石斑
4	あゆビブリオ病不活化ワクチン	香魚弧菌症不活化疫苗	鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) A型菌 PT-479 株或同等認定之菌株	香魚	香魚
5	さけ科魚類ビブリオ病不活化ワクチン	鮭科魚類弧菌症不活化疫苗	1. 弧菌屬亞種 (<i>Vibrio subspecies</i>) J-0-1 型菌 VA1669 株或同等認定之菌株 2. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型菌 VA775 株或同等認定之菌株	虹鱒	鮭科魚種
6	ひらめエドワジエラ症(多糖アジュバント加)不活化ワクチン	比目魚愛德華氏病不活化疫苗(添加多醣佐劑)	愛德華氏菌 (<i>Edwardsiella tarda</i>)	比目魚	比目魚
7	ひらめβ溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン	比目魚β溶血性鏈球菌症不活化疫苗	瓶鼻海豚鏈球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>) F2K 株或同等認定之菌株	比目魚	比目魚
8	ぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン	鯽魚α溶血性鏈球菌症不活化疫苗	格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KS-7M 株或同等認定之菌株	青甘鯨	鯽屬魚類
9	ぶりα溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン(注射型)	鯽魚α溶血性鏈球菌症不活化疫苗(注射型)	格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9408 菌株或同等認定之菌株	紅甘鯨或青甘鯨	鯽屬魚類
10	ぶりα溶血性レンサ球菌症(酵素処理)不活化ワクチン	鯽魚α溶血性鏈球菌症不活化疫苗(酵素處理)	格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) TE9501 菌株或同等認定之菌株	紅甘鯨或青甘鯨	鯽屬魚類
11	ぶりα溶血性レンサ球菌症2価不活化ワクチン	鯽魚α溶血性鏈球菌症雙價不活化疫苗	格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG 一型菌及 KG- + 非凝集型菌	青甘鯨	鯽屬魚類
12	ぶりビブリオ病不活化ワクチン	鯽魚弧菌症不活化疫苗	鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型菌	青甘鯨	鯽屬魚類
13	ひらめストレプトコッカス・パラウベリス(I型・II型)感染症・β溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	比目魚鏈球菌 (<i>Streptococcus parauberis</i>) (I型・II型) 感染症・β溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 鏈球菌 (<i>Streptococcus parauberis</i>) I 型菌・II 型菌 2. 瓶鼻海豚鏈球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>)	比目魚	比目魚
14	ぶりα溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン	鯽魚α溶血性鏈球菌症・類結節症混合不活化疫苗(添加油性佐劑)	1. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) INS050 株或同等認定之菌株 2. 發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>) Pp66 株或同等認定之菌株	青甘鯨	青甘鯨、紅甘鯨
15	ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	鯽魚弧菌症・α溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 KT-5 菌株或同等認定之菌株 2. 乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KS-7M 菌株或同等認定之菌株	紅甘鯨或青甘鯨	鯽屬魚類
16	ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症混合不活化ワクチン	鯽魚弧菌症・α溶血性鏈球菌・無乳鏈球菌感染症混合不活化疫苗	1. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 2. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) 3. 無乳鏈球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)	紅甘鯨	紅甘鯨
17	ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン	鯽魚弧菌症・α溶血性鏈球菌・類結節症混合不活化疫苗(油性佐劑)	1. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 2. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) 3. 發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>)	青甘鯨	青甘鯨、紅甘鯨
18	イリドウイルス病・β溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症・β溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) 2. 瓶鼻海豚鏈球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>)	真鯛	真鯛

19	イリドウイルス病・ぶりα溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症・鯽魚α溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) 2. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>)	紅甘鰺或青甘鰺	鯽屬魚類
20	イリドウイルス病・ぶりピブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症・鯽魚弧菌症・α溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) YI-717 株或同等認定之毒株 2. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 KT-5 株或同等認定之菌株 3. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KS-7M 株或同等認定菌株	紅甘鰺或青甘鰺	鯽屬魚類
21	イリドウイルス病・ぶりピブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・類結節症混合 (多糖アジュバント加) 不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症・鯽魚弧菌症, α溶血性鏈球菌症, 類結節症混合不活化疫苗 (添加多醣佐劑)	1. 真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) 2. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 3. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) 4. 發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>)	紅甘鰺或青甘鰺	鯽屬魚類
22	イリドウイルス病・ぶりピブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・類結節症混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン	真鯛虹彩病毒感染症・鯽魚弧菌症, α溶血性鏈球菌症, 類結節症混合不活化疫苗 (添加油性佐劑)	1. 真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) 2. 鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 3. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) 4. 發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>)	青甘鰺	青甘鰺

備註：鯽屬魚類 (*Genus Seriola*) 包含 9 個物種，分別為卡彭氏鯽 (*Seriola carpenteri*)、紅甘鰺 (又稱高體鯽、杜氏鯽, *Seriola dumerilii*)、斑紋鯽 (*Seriola fasciata*)、馬鯽 (*Seriola hippos*)、黃尾鯽 (*Seriola lalandi*)、祕魯鯽 (*Seriola peruana*)、青甘鰺 (又稱五條鯽, *Seriola quinqueradiata*)、長鰭鯽 (*Seriola rivoliana*) 及環帶鯽 (*Seriola zonata*)。

表 2、虹彩病毒疫苗安全試驗及效力試驗比較表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗	安全試驗方法二擇一 1. 取體重達 5-15g 的真鯛 180 尾以上, 分成 2 組 (1 組 90 尾以上)。1 組做為免疫組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗, 另一組則作為對照組。免疫後以 22-28°C 水溫及循環式環境進行飼育, 觀察 10 天。 2. 取體重達 5-50g 的真鯛 180 尾以上, 各分成 2 組 (1 組 90 尾以上)。1 組肌肉注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組, 另一組則作為對照組。免疫後以 22-28°C 水溫及循環式環境進行飼育, 觀察 10 天。 3. 判定: 觀察期間, 免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束魚隻。	1. 攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) Ehime-1/CV 毒株或同等認定之毒株。 2. 將真鯛虹彩病毒強毒株培養病毒液進行 10 倍稀釋, 預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋, 將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段稀釋) 做為攻毒液。	1. 試驗方法: 停餌 24 小時的免疫組及對照組, 各分成 3 組 (每組 30 尾), 每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液, 觀察 14 天, 記錄各組的死亡情形。 2. 判定: 對照組死亡率有 60% 以上時, 免疫組的存活率至少要有 1 階比對照組存活率高 40% 以上。
虹彩病毒感染症不活化疫苗 (油性佐劑)	1. 試驗方法: 取體重達 30-50g 的青甘鰺 110 尾以上, 分成 2 組 (1 組 55 尾以上)。1 組做為免疫組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗, 另 1 組則作為對照組。免疫後以 24°C 水溫及循環式環境進行飼育, 觀察 21 天, 觀察期結束後隨機解剖免疫組及各對照組 10 尾, 觀察注射部位狀況。 2. 判定: 免疫組除初期攝餌狀況較差外, 應無其他臨床不良症狀, 注射部位解剖時應無異常狀態。	使用安全試驗結束魚隻。	1. 攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) IJF245 株或同等認定之毒株。 2. 將真鯛虹彩病毒強毒株培養病毒液進行 10 倍稀釋, 預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋, 將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段稀釋) 做為攻毒液。	1. 試驗方法: 停餌 24 小時的免疫組及對照組, 各分成 3 組 (每組 15 尾以上), 每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液, 於水溫 26°C 下飼養觀察 21 天, 記錄各組的死亡情形。 2. 判定: 對照組死亡率有 50% 以上時, 免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組, 具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症・β溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 試驗方法: 取體重達 5-50g 的真鯛 80 尾以上, 分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組肌肉注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組, 另 1 組則作為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育, 觀察 14 天, 第 13 天開始將水溫上升至 27°C。	取體重達 5-20g 的真鯛 180 尾以上, 分成 2 組 (1 組 90 尾以上), 1 組肌肉注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組, 另 1 組肌肉注射 PBS 做為對照組。	1 攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) RIE12-1 株或同等認定之毒株。 2. 將真鯛虹彩病毒強毒株培養病毒液進行 10 倍稀釋, 預測對照組之死亡率為 40-80% 之稀釋, 將該 40-80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段)	1. 試驗方法: 免疫後 10 天, 停餌 12 小時以上的免疫組及對照組各分成 3 組 (每組 30 尾以上), 每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液, 觀察 20 天, 記錄各組的死亡情形。 2. 判定: 對照組死亡率有 20% 以

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

	2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。		稀釋) 做為攻毒液。	上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鱒魚 α 溶血性鏈球菌混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 10 g 以上的紅甘鰺或青甘鰺 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	取體重達 5-15g 的真鯛 180 尾以上，各分成 2 組 (1 組 90 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組為對照組，於 22-28 °C 水溫及循環式環境飼育 10 天。	1. 攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) Ehime-1/CV 毒株或同等認定之毒株。 2 將真鯛虹彩病毒強毒株培養病毒液進行 10 倍稀釋，預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋，將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段稀釋) 做為攻毒液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組，各分成 3 組 (每組 30 尾)，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組的存活率至少要有 1 階比對照組存活率高 40% 以上。
真鯛虹彩病毒感染症·鱒魚弧菌症· α 溶血性鏈球菌混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 15-100 g 的紅甘鰺或青甘鰺魚 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用紅甘鰺、青甘鰺或真鯛皆可 (1) 取 15-50g 的紅甘鰺或青甘鰺 180 尾以上，各分成 2 組 (1 組 90 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組，於 27°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。 (2) 取體重達 5-15g 的真鯛 180 尾以上，各分成 2 組 (1 組 90 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組，於 22-28°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。	(1) 若使用紅甘鰺或青甘鰺，攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) 西海 0619 株或同等認定之毒株。 (2) 若使用真鯛，攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus)。Ehime-1/CV 株或同等認定之毒株 (3) 將病毒液進行 10 倍稀釋，共 3 階段稀釋做為攻毒液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組，各分成 3 組 (每組 30 尾)，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液。 (1) 若使用紅甘鰺或青甘鰺，觀察 20 天，記錄各組的死亡情形。 (2) 若使用真鯛，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定： (1) 若使用紅甘鰺或青甘鰺：對照組死亡率有 20% 以上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。 (2) 若使用真鯛：對照組有 60% 以上死亡率時，免疫組的存活率至少要有 1 階比對照組存活率高 40% 以上。
真鯛虹彩病毒感染症·鱒魚弧菌症， α 溶血性鏈球菌症，類結節症混合不活化疫苗 (添加多醣佐劑)	1. 試驗方法：取體重 30-300g 以上的紅甘鰺或青甘鰺 20 尾以上，分成 2 組 (1 組 10 尾以上)。1 組腹腔注射 0.5 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀。	取體重達 30-50g 的紅甘鰺或青甘鰺 180 尾以上，分成 2 組 (1 組 90 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組為對照組，於 27°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。	攻毒株為真鯛虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus) Ka-20/C 株或同等認定之毒株，將病毒液進行 10 倍稀釋，共 3 階段稀釋做為攻毒液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組，各分成 3 組 (每組 30 尾)，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 20% 以上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鱒魚弧菌症， α 溶血性鏈球菌症，類結節症混合不活化疫苗 (添加油性佐劑)	1. 試驗方法：取體重 15-100g 的青甘鰺 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。	取體重 15-100g 的青甘鰺 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育 14 天。	無。	1. 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，進行 ELISA 力價測定。 2. 判定：免疫組 10 個血清中必須有 4 個血清其各別吸光值大於 0.25 以上，且 10 個血清平均吸光值亦須在 0.25 以上，對照組 10 個血清各別吸光值皆須在 0.25 以下且平均吸光值須在 0.125 以下。

表 3、神經壞死病毒疫苗之安全試驗及效力試驗比較表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
石斑魚神經壞死病毒不活化疫苗	<p>1. 試驗方法：取體重達 10-100g 的七帶石斑 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組則作為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 20 天。</p> <p>2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	使用安全試驗結束魚隻。	無。	<p>1. 試驗方法：進行血清抗體中和試驗</p> <p>(1) 中和試驗用毒株：神經壞死病毒 SGEhi100-N 株或同等認定之毒株。</p> <p>(2) 飼育 20 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，進行中和試驗，以 Behrens & Kerber 法計算中和抗體力價。</p> <p>2. 判定：免疫組之中和抗體力價幾何平均值須為 115 倍以上，對照組之中和抗體力價之幾何平均值，須小於 57 倍。</p>

表 4、弧菌疫苗之安全試驗及效力試驗比較表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
香魚弧菌症不活化疫苗	<p>1. 試驗方法：</p> <p>(1) 待測疫苗以飼育水 10 倍稀釋後做為試驗材料。</p> <p>(2) 取體重 3g 以上的香魚 120 尾以上，分成 2 組（1 組 60 尾以上）。1 組為免疫組，以試驗材料 1000 mL 搭配魚隻總體重 500g 以下之比率，在打氣的狀況下浸泡 2 分鐘，另一組為對照組，與免疫組相同操作下浸泡飼育水。免疫後以 19-25°C 水溫及流水式環境進行飼育，觀察 21 天。</p> <p>2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	使用安全試驗結束後魚隻。	<p>1. 攻毒菌株為鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) A 型 PT-479 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將攻毒菌液進行 10 倍稀釋，預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋，將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋（共 3 階段稀釋）做為攻毒液。</p> <p>3. 攻毒菌液量須為試驗魚隻總重量的 5-20 倍。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各分成 3 組（每組 20 尾），每組分別於不同階段攻毒菌液中在打氣的狀況下浸泡 10 分鐘，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組有 60% 以上死亡率時，免疫組的存活率至少要有 1 階比對照組存活率高 40% 以上。</p>
鮭科魚類弧菌症不活化疫苗	<p>1. 試驗方法：</p> <p>(1) 待測疫苗以飼育水 10 倍稀釋後做為試驗材料。</p> <p>(2) 取體重 2-50g 的虹鱈 240 尾以上，分成 2 組（1 組 120 尾以上）。1 組為免疫組，以試驗材料 1000 mL 搭配魚隻總體重 500g 以下之比率，在打氣的狀況下浸泡 2 分鐘，另一組為對照組，與免疫組相同操作下浸泡飼育水。免疫後以 12-18°C 水溫及流水式環境進行飼育，觀察 21 天。</p> <p>2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	使用安全試驗結束後魚隻。	<p>1. 攻毒菌株為弧菌屬亞種 (<i>Vibrio subspecies</i>) J-0-1 型菌 N-7802 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 另一攻毒菌株為鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型菌 NCMB571 株或同等認定之菌株。</p> <p>3. 將攻毒菌液進行 10 倍稀釋，預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋，將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋（共 3 階段稀釋）做為攻毒液。</p> <p>4. 攻毒菌液量須為試驗魚隻總重量的 5-20 倍。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各分成 6 組（每組 20 尾），3 組分別於弧菌屬亞種 (<i>Vibrio subspecies</i>) 3 階段攻毒菌液中在打氣狀況下浸泡 20 分鐘，另 3 組於鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) 3 階段攻毒菌液中在打氣狀況下浸泡 20 分鐘，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組有 60% 以上死亡率時，免疫組的存活率至少要有 1 階比對照組存活率高 40% 以上。</p>
鯽魚弧菌症不活化疫苗	<p>1. 試驗方法：</p> <p>(1) 待測疫苗以飼育水 10 倍稀釋後做為試驗材料。</p> <p>(2) 取體重為 1.0-10.7g 的青甘鯽 40 尾以上，分成 2 組（1 組 20 尾以上）。1 組為免疫組，以試驗材料 1000 mL 搭配魚隻總體重 370g 以下之比率，在打氣的狀況下浸泡 30 秒，另一組為對照組，與免疫組相同操作下浸泡飼育水。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天。</p> <p>2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	使用安全試驗結束後魚隻。	<p>1. 攻毒菌株為鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>) J-0-3 型 NUF482Y1 菌株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 20 尾以上，於攻毒菌液中在打氣狀況下浸泡 2 分鐘，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 30g 以上的紅甘鰻或鯽魚 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	取體重 30g 以上的紅甘鰻或青甘鰻 20 尾以上，分成 2 組（1 組 10 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 20°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。	無。	1. 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法（Microtiter Method）進行凝集抗體力價測定試驗。 2. 判定：免疫組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 16 倍以上，對照組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 2 倍以下。
鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌、無乳鏈球菌感染不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 20-100g 的紅甘鰻 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射無菌水做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	取體重 20-100g 以上的紅甘鰻 20 尾以上，分成 2 組（1 組 10 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射無菌水做為對照組。免疫後以 23°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，第 13 天時將水溫上升至 25°C。	無。	1. 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法（Microtiter Method）進行凝集抗體力價測定試驗。 2. 判定：免疫組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 16 倍以上，對照組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 4 倍以下。
鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌、類結節症混合不活化疫苗（油性佐劑）	1. 試驗方法：取體重 30-100g 的青甘鰻 110 尾以上，分成 2 組（1 組 55 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天，再由免疫組及對照組各撈出 10 尾，剖檢檢查注射部位。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。	使用安全試驗結束魚隻。	1. 攻毒菌株為鰻弧菌（ <i>Vibrio anguillarum</i> ）J-0-3 型 INS222 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$ ）。
真網虹彩病毒感染症、鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗	1. 試驗方法：選體重 15-100 g 的紅甘鰻或青甘鰻 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用紅甘鰻、青甘鰻或真鯛皆可 (1) 取 15-50g 的紅甘鰻或青甘鰻 180 尾以上，各分成 2 組（1 組 90 尾以上），1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組，於 27°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。 (2) 取體重達 5-15g 的真鯛 180 尾以上，各分成 2 組（1 組 90 尾以上），1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組，於 22-28°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。	1. 鰻弧菌（ <i>Vibrio anguillarum</i> ）效力試驗可執行凝集抗體力價試驗或攻毒試驗，二擇一。 2. 攻毒試驗：攻毒菌株為鰻弧菌（ <i>Vibrio anguillarum</i> ）040755 株或同等認定之菌株。	1. 凝集抗體力價試驗 (1) 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法（Microtiter Method）進行凝集抗體力價測定試驗。 (2) 判定：免疫組之血清抗體凝集力價皆須在 4 倍以上，幾何平均值須在 16 倍以上。 2. 攻毒試驗 (1) 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 (2) 判定：對照組死亡率有 35% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$ ）。
真網虹彩病毒感染症、鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌症、類結節症混合不活化疫苗（添加多醣佐劑）	1. 試驗方法：選體重 30-300g 以上的紅甘鰻或青甘鰻 20 尾以上，分成 2 組（1 組 10 尾以上）。1 組腹腔注射 0.5 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀。	取體重達 30-50g 的紅甘鰻或青甘鰻 180 尾以上，分成 2 組（1 組 90 尾以上），1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組為對照組，於 27°C 水溫及循環式環境飼育 10 天。	無。	1. 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法（Microtiter Method）進行凝集抗體力價測定試驗。 2. 判定：免疫組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 16 倍以上，對照組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 2 倍以下。

真網虹彩病毒感染症、鯽魚弧菌症， α 溶血性鏈球菌症，類結節症混合不活化疫苗（添加油性佐劑）	1. 試驗方法：取體重 15-100g 的青甘鯪 80 尾以上，分成 2 組（1 組 40 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。	使用安全試驗結束魚隻。	無。	1. 試驗方法：飼育 14 天後分別從免疫組和對照組各取出 10 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法（Microtiter Method）進行凝集抗體力價測定試驗。 2. 判定：免疫組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 16 倍以上，對照組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 4 倍以下。
-------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------	----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

表 5、鏈球菌疫苗之安全試驗及效力試驗比較表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
比目魚 β 溶血性鏈球菌症不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 30-150 g 的比目魚 40 尾以上，分成 2 組（1 組 20 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 20°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，結束前一天將飼育水溫上升至 25°C。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 浸泡攻毒或腹腔注射攻毒二擇一 2. 浸泡攻毒： （1）攻毒菌株為瓶鼻海豚鏈球菌（ <i>Streptococcus iniae</i> ）CIN 株或同等認定之菌株。 （2）將可造成對照組死亡率約 60% 之菌液做為攻毒菌液。 3. 腹腔攻毒： （1）攻毒菌株為瓶鼻海豚鏈球菌（ <i>Streptococcus iniae</i> ）CIN 株或同等認定之菌株。 （2）將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1 浸泡攻毒試驗方式： （1）停餌 24 小時的免疫組及對照組各 20 尾以上，於攻毒菌液中在打氣狀況下浸泡 30 分鐘，攻毒後使 25°C 水溫在 2-4 小時間升溫至 27°C，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 （2）判定：對照組死亡率有 60% 以上死亡率時，其相對存活率須高於 60%。 2. 腹腔注射攻毒試驗方式： （1）停餌 24 小時的免疫組及對照組各 20 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，攻毒後使 25°C 水溫在 2-4 小時間升溫至 27°C，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 （2）判定：對照組死亡率有 80% 以上死亡率時，其相對存活率須高於 60%。 3. 相對存活率（Relative percentage survival, RPS）計算公式：[1 - (免疫組死亡率(%) ÷ 對照組死亡率(%)) × 100]。
鯽魚 α 溶血性鏈球菌症不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 100 g 以上的青甘鯪 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組為免疫組，每日將相當於魚體重 1kg 混合 10 mL 之待測疫苗比率混合入飼料中，連續投予餵飼 5 天，另一組為對照組，以水混合飼料，連續投予餵飼 5 天。投予後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌（ <i>Lactococcus garvieae</i> ）KG 9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$ ）。
鯽魚 α 溶血性鏈球菌症不活化疫苗（注射型）	1. 試驗方法：取體重 30 g 以上的紅甘鯪或青甘鯪 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育。 2. 觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌（ <i>Lactococcus garvieae</i> ）KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$ ）。

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

<p>鱒魚α溶血性鏈球菌症不活化疫苗（酵素處理）</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 100g 以上的紅甘鰲或青甘鰲 30 尾以上，分成 2 組（1 組 15 尾以上），1 組為免疫組，每日將相當於魚體重 1kg 混合 0.5 mL 之待測疫苗比率混合入飼料中，連續投予餵飼 5 天，另一組為對照組，以水混合飼料，連續投予餵飼 5 天。投予後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	<p>使用安全試驗結束後魚隻。</p>	<p>1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌（<i>Lactococcus garvieae</i>）KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$）。</p>
<p>鱒魚α溶血性鏈球菌症雙價不活化疫苗</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 20-100 g 的青甘鰲 60 尾以上，分成 2 組（1 組 30 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	<p>使用安全試驗結束後魚隻。</p>	<p>1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌（<i>Lactococcus garvieae</i>）KG-型強菌株 KS-7C 株或同等認定之菌株。 2. 另一攻毒菌株為格式乳酸球菌（<i>Lactococcus garvieae</i>）KG-·KG + 非凝集型強菌株 LC1311 株或同等認定之菌株。 3. 將可造成對照組 80-90% 以上死亡率做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時後，將免疫組 30 尾及對照組 30 尾各分成 2 組（每組 15 尾），其中 1 組腹腔注射 0.1 mL KG-型強菌株，另 1 組腹腔注射 0.1 mL KG-·KG + 非凝集型強菌株，攻毒後於 25°C 水溫下飼養觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定： (1) KG-型強菌株攻毒後對照組死亡率有 60% 時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$）。 (2) KG-·KG + 非凝集型強菌株攻毒後，對照組死亡率有 50% 時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$）。</p>
<p>比目魚鏈球菌（<i>Streptococcus parauberis</i>）（I 型·II 型）感染症·β溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 30-150 g 的比目魚 40 尾以上，分成 2 組（1 組 20 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 20°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，結束前一天將飼育水溫上升至 25°C。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。</p>	<p>1. 鏈球菌（<i>Streptococcus parauberis</i>）：取體重 30-150 g 的比目魚 160 尾以上，分成 2 組（1 組 80 尾以上）。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 20°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，結束前一天將飼育水溫上升至 25°C。 2. 瓶鼻海豚鏈球菌（<i>Streptococcus iniae</i>）：使用安全試驗結束魚隻。</p>	<p>1. 鏈球菌（<i>Streptococcus parauberis</i>） (1) 攻毒菌株為 <i>Streptococcus parauberis</i> I 型強毒菌 M4Y 株或同等認定之菌株。 (2) 攻毒菌株為 <i>Streptococcus parauberis</i> II 型強毒菌 M5E 株或與此同等以上之毒株。 (3) 將可造成對照組 35% 以上死亡率和其 10 倍稀釋菌液做為攻毒菌液（共 2 階段）。 2. 瓶鼻海豚鏈球菌（<i>Streptococcus iniae</i>）。 (1) 攻毒菌株為瓶鼻海豚鏈球菌（<i>Streptococcus iniae</i>）CIN 株或同等認定之菌株。 (2) 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 鏈球菌（<i>Streptococcus parauberis</i>）： (1) 試驗方法：停餌 24 小時後，將免疫組 80 尾及對照組 80 尾各分成 4 組（每組 20 尾），其中 2 組分別腹腔注射 0.1 mL I 型強菌液之 2 階段攻毒菌液，其他 2 組腹腔注射 0.1 mL II 型強菌液之 2 階段攻毒菌液，攻毒後使 25°C 水溫在 2-4 小時間升溫至 27°C，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。此外，攻毒後第 4 天，停餌 48 小時，攻毒後第 5 天起至第 14 天，將溶氧量調整至約 4-5 mg/L。 (2) 判定：對照組死亡率有 35% 以上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異（Fisher's exact test, $p < 0.05$）。 2. 瓶鼻海豚鏈球菌（<i>Streptococcus iniae</i>）： (1) 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 20 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，攻毒後使 25°C 水溫在 2-4 小時間升溫至 27°C，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 (2) 判定：對照組死亡率有 80% 以上死亡率時，其相對存活率須高於 60%。</p>

				(3) 相對存活率 (Relative percentage survival, RPS) 計算公式：[1- (免疫組死亡率 (%) ÷ 對照組死亡率 (%)) x100])。
鯽魚 α 溶血性鏈球菌 症·類結節症混合不活化 疫苗 (添加油性佐劑)	1. 試驗方法：取體重 30-100g 的青甘鯽 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天，再由免疫組及對照組各撈出 10 尾，剖檢檢查注射部位。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG 9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
鯽魚弧菌症· α 溶血性鏈 球菌症混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 30g 以上的紅甘鯽或青甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 菌株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
鯽魚弧菌症· α 溶血性鏈 球菌·無乳鏈球菌感染症 混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 20-100g 的紅甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射無菌水做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	1. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>)：使用安全試驗結束後魚隻。 2. 無乳鏈球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)：取體重 20-100g 的紅甘鯽 180 尾以上，分成 2 組 (1 組 90 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射無菌水做為對照組。免疫後以 23°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，第 13 天時將水溫上升至 25°C。	1. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>)： KG9502 菌株或同等認定之菌株。 2. 無乳鏈球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)： (1) 攻毒菌株為無乳鏈球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>) 04K01 菌株或同等認定之菌株。 (2) 將攻毒菌液進行 10 倍稀釋，預測對照組之死亡率為 50-90% 之稀釋，將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段稀釋) 做為攻毒液。	1. 格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>)： (1) 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 (2) 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。 2. 無乳鏈球菌 (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>)： (1) 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各分成 3 組 (每組 30 尾)，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液，之後以數小時至半天時間，將水溫由 25°C 上升到 29°C，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 (2) 判定：對照組死亡率有 30% 以上時，免疫組至少要有

臺日水產魚用疫苗檢驗標準研析

				1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)
鯽魚弧菌症、 α 溶血性鏈球菌·類結節症混合不活化疫苗 (油性佐劑)	1. 試驗方法：取體重 30-100g 的青甘鯽 110 尾以上，分成 2 組 (1 組 55 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天，再由免疫組及對照組各撈出 10 尾，剖檢檢查注射部位。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症、 β 溶血性鏈球菌混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重達 5-50g 的真鯛 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組肌肉注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組則作為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天，第 13 天開始將水溫上升至 27°C。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束後魚隻。	1. 攻毒菌株為瓶鼻海豚鏈球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>) SI12E 2. 將可造成對照組死亡率約 60-80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 12 小時以上的免疫組及對照組各分成 2 組 (每組 20 尾以上)，每尾分別腹腔接種 0.1 mL 攻毒菌液後，於水溫 30°C 下飼養觀察 7 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 50% 以上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鯽魚 α 溶血性鏈球菌混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 10g 以上的紅甘鯽或青甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率為 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鯽魚弧菌症· α 溶血性鏈球菌混合不活化疫苗	1. 試驗方法：取體重 15-100 g 的紅甘鯽或青甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束魚隻。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率為 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鯽魚弧菌症， α 溶血性鏈球菌，類結節症混合不活化疫苗 (添加多醣佐劑)	1. 試驗方法：取體重 30-300g 以上的紅甘鯽或青甘鯽 20 尾以上，分成 2 組 (1 組 10 尾以上)。1 組腹腔注射 0.5 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。 2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀。	取體重達 30-300g 的紅甘鯽或青甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 為對照組，於 25°C 水溫及循環式環境飼育 14 天。	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 菌株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率為 80% 之菌液做為攻毒菌液。	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。 2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。
真鯛虹彩病毒感染症·鯽魚弧菌症， α 溶血性鏈球菌，類結節症混合不活化疫苗 (添加油性佐劑)	1. 試驗方法：取體重 15-100g 的青甘鯽 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS	取體重 15-100g 的青甘鯽 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS	1. 攻毒菌株為格式乳酸球菌 (<i>Lactococcus garvieae</i>) KG9502 株或同等認定之菌株。 2. 將可造成對照組死亡率約 80%	1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循

	<p>組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。</p> <p>2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。</p>	<p>做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育 14 天。</p>	<p>之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------	-------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

表 6、發光桿菌疫苗之安全試驗及效力試驗表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
<p>鯽魚 α 溶血性鏈球菌症·類結節症混合不活化疫苗 (添加油性佐劑)</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 30-100g 的青甘鯪 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天，再由免疫組及對照組各撈出 10 尾，剖檢檢查注射部位。</p> <p>2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。</p>	<p>使用安全試驗結束魚隻。</p>	<p>1. 攻毒菌株為發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>) INS197 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>
<p>鯽魚弧菌症、α 溶血性鏈球菌·類結節症混合不活化疫苗 (油性佐劑)</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 30-100g 的青甘鯪 110 尾以上，分成 2 組 (1 組 55 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 22°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 21 天，再由免疫組及對照組各撈出 10 尾，剖檢檢查注射部位。</p> <p>2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。</p>	<p>使用安全試驗結束後魚隻。</p>	<p>1. 攻毒菌株為發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>) INS197 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>
<p>真鯛虹彩病毒感染症、鯽魚弧菌症，α 溶血性鏈球菌症，類結節症混合不活化疫苗 (添加多醣佐劑)</p>	<p>1. 試驗方法：選體重 30-300g 以上的紅甘鯪或青甘鯪 20 尾以上，分成 2 組 (1 組 10 尾以上)。1 組腹腔注射 0.5 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。</p> <p>2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀。</p>	<p>取體重達 30-300g 的紅甘鯪或青甘鯪 180 尾以上，分成 2 組 (1 組 90 尾以上)，1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 為對照組，於 25°C 水溫及循環式環境飼育 14 天。</p>	<p>1. 攻毒菌株為發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>) AW-02 G-3 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將攻毒菌液進行 10 倍稀釋，預測對照組之死亡率為 80% 之稀釋，將該 80% 之稀釋和其前後階之稀釋 (共 3 階段稀釋) 做為攻毒液。</p>	<p>1. 試驗方法：經停餌 24 小時的免疫組及對照組，各分成 3 組 (每組 30 尾)，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 各階段攻毒液，觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 50% 以上時，免疫組至少要有 1 階段其存活率高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>
<p>真鯛虹彩病毒感染症、鯽魚弧菌症，α 溶血性鏈球菌症，類結節症混合不活化疫苗 (添加油性佐劑)</p>	<p>1. 試驗方法：取體重 15-100g 的青甘鯪 80 尾以上，分成 2 組 (1 組 40 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育，觀察 14 天。</p> <p>2. 判定：免疫組除初期攝餌狀況較差外，應無其他臨床不良症狀，注射部位解剖時應無異常狀態。</p>	<p>取體重 15-100g 的青甘鯪 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 25°C 水溫及循環式環境進行飼育 14 天。</p>	<p>1. 攻毒菌株為發光桿菌 (<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>) P09A14 株或同等認定之菌株。</p> <p>2. 將可造成對照組死亡率約 80% 之菌液做為攻毒菌液。</p>	<p>1. 試驗方法：停餌 24 小時的免疫組及對照組各 15 尾以上，每尾分別腹腔注射 0.1 mL 攻毒菌液，於 25°C 水溫及循環式環境飼育觀察 14 天，記錄各組的死亡情形。</p> <p>2. 判定：對照組死亡率有 60% 以上時，免疫組存活率須高於對照組，具有統計學顯著差異 (Fisher's exact test, $p < 0.05$)。</p>

表 7、愛德華氏菌疫苗之安全試驗及效力試驗比較表

檢驗標準	安全試驗方法及判定	效力試驗動物免疫方法	效力攻毒菌液	效力試驗方法及判定
比目魚愛德華氏病不活化疫苗(添加多醣佐劑)	1. 試驗方法：取體重達 20-50g 的比目魚 30 尾以上，分成 2 組 (1 組 15 尾以上)。1 組腹腔注射 0.1 mL 待測疫苗做為免疫組，間隔 2 週後補強，另 1 組腹腔注射 PBS 做為對照組。免疫後以 20°C 水溫及循環式環境進行飼育，共觀察 28 天 (從第一次免疫算起)，安全試驗的最後一天將水溫上升至 25° C。 2. 判定：觀察期間，免疫組及對照組不得有臨床上的異常。	使用安全試驗結束魚隻。	無。	1. 試驗方法：觀察 28 天後分別從免疫組和對照組各取出 15 尾，進行採血，在 45°C 下非働化血清 20 分鐘，以微量測定法 (Microtiter Method) 進行凝集抗體力價測定試驗。 2. 判定：免疫組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 210 倍以上，對照組之血清抗體凝集力價幾何平均值須在 10 倍以下。

參考文獻

1. European pharmacopoeia 9.0. 01/2017:1580 Vibriosis (cold-water) vaccine (inactivated) for salmonids.
2. 水產用醫藥品之使用報告。消費安全局畜水產安全管理課，農林水產省。http : //www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/index.html
3. 動物用藥品檢驗標準。行政院農業委員會公告。全國法規資料庫。http : //law.moj.gov.tw/
4. 動物用生物學的製劑檢定基準。動物醫藥品檢查所。http : //www.maff.go.jp/nval/kijyun/index.html

Analysis of the Aquatic Vaccine Inspection Standard for both Taiwan and Japan

CT Lin*, IT Ko, JH Tsai, PY Chen, SR Yeh, SH Lee

Animal Drugs Inspection Branch,
Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Taiwan raises a variety of warm-water fishes such as grouper, mullet, tilapia and bass etc. Although the aquatic breeding skills from breeders are well-known and qualified, there still has some aquatic disease problems to lead to economic loss. For aquatic diseases, we often use antibiotic and chemical drugs to control, and for epidemic prevention policy we should replace original drugs administration to the active immunity induced by vaccines, which way could lessen the food security doubt from people. Currently, aquatic vaccine inspection standards of Taiwan have two types and pathogen species of vaccine including Grouper iridovirus and *Streptococcus iniae*. In Taiwan, our research institutes and universities are studying and creating aquatic vaccines and in Japan, there are twenty-two types of aquatic vaccine inspection standards. Their vaccine administration including immersion, oral administrating, intramuscular injection and intraperitoneal injection etc. The vaccine seeds including red sea bream iridovirus, nervous necrosis virus, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela subsp. piscicida* and *Edwardsiella tarda* etc. It is noted that a vaccine made of the same pathogen should use different testing method and identified standards for the efficacy once the vaccinating target is different. This report can be a reference for draw up aquatic vaccine inspection standard, and can be used for research and studying institute to develop aquatic biopharmaceuticals and testing standards as well.

Keywords: *aquaculture, aquatic vaccine, inspection standard*