

保存時間對乾燥兔化豬瘟疫苗效力之影響

謝政橘*、江 翰、曾俊憲、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 有鑑於豬瘟對國內畜牧產業的影響，本所過去已開發出兔化豬瘟疫苗，並於各豬場注射免疫後均具不錯成效。今配合動植物防疫檢疫局對動物藥品之抽檢，檢測疫苗在有效期限內，是否仍保有合於標準之病毒力價，故由本所製劑研究組品管保存庫中隨機選出三批過期半年至一年半之乾燥兔化豬瘟疫苗，輔以動物實驗證明其效力。本次的實驗結果顯示，在正常保存之下的兔化豬瘟疫苗，過期一年時仍保有合格之病毒力價。

關鍵詞：乾燥兔化豬瘟疫苗，有效期限，效力

緒言

豬瘟係由豬瘟病毒引起之高度傳染之急性敗血症，主要特徵為全身性出血，感染率與死亡率均高達95%。一般多為急性型，感染保育豬(8-12週)為最普通。感染豬隻有精神不振、厭食、倦伏、姿勢歪斜、喜躺下、經常堆擠在一起，皮毛粗糙。在症狀出現前有高熱(40.5-42.5°C)，早期便秘後下痢，末期在腹部皮膚有彌漫性充血及紫斑，在耳根、尾部及四肢特別顯著，神經症狀如肌肉發抖，抽搐及後肢麻痺亦為常見，病發後7至15天死亡。懷孕母豬感染會有木乃伊化，死產或流產的現象(8,12)。然世界動物衛生組織(OIE)將豬瘟歸類於會影響國際畜產品貿易及造成國家整體社會、經濟重大影響之甲類動物傳染病。因此各國皆將豬瘟的防疫工作列為國家動物防疫的重點工作，採取必要的預防、防疫和檢疫措施，以提升畜牧產業之收益。世界主要豬肉生產及輸出國如美國、加拿大及歐盟各國如英國、丹麥等，皆曾以全場撲殺之政策，成功地撲滅豬瘟成為非疫國。除可降低毛豬生產成本，提升外銷競爭力，也因無豬瘟而

符合更多輸入國之動物檢疫要求，另一方面，亦可依國際動物檢疫慣例，以國際許可的檢疫規範，對豬瘟疫區國家採取限制豬肉及其他動物產品進口措施，以保護國內產業。有鑑於豬瘟對臺灣畜牧產業的影響，本所過去已開發出乾燥兔化豬瘟疫苗並於各豬場注射免疫後，均具不錯成效。然我國四十多年來實施乾燥兔化豬瘟疫苗免疫結果，雖使豬瘟發生率大為降低，但仍無法有效完全控制田間的豬瘟病毒。令人聯想到現行使用的乾燥兔化豬瘟疫苗其實質的效期內是否真正具有保護效力，故本次實驗是為配合動植物防疫檢疫局對動物藥品之抽檢，檢測疫苗在有效期間內，是否仍保有合於標準之病毒力價，故此次由品管保存庫中隨機選出3批過期半年至一年半之疫苗，以相關實驗證明其病毒含有量作為其效力依據之評估。

材料及方法

實驗動物

本實驗之試驗用兔係由本所實驗動物選體重約2.0至2.5公斤且兔出血熱抗體呈陰性之健康紐西蘭

*插印本索取作者

白兔，進行此次實驗室試驗。

檢測樣本

本實驗由本所製劑研究組品管冷藏保存庫中隨機選出 3 批過期半年至一年半之乾燥兔化豬瘟疫苗，分別為批號 2613 (過期一年半)、批號 2639 (過期一年) 及批號 2665 (過期半年)，評估病毒力價及產品自身是否變質，進行實驗室試驗。

檢測項目係依據《動物用藥品檢驗標準》之乾燥兔化豬瘟疫苗檢驗標準相關規範，分別進行分析試驗並將其體溫變化記錄並繪製成圖表以利分析判定，此次檢測項目如下：

特性試驗

須具固有理學性狀，且無異物及異常氣味，溶解後須濃度均一。

無菌試驗

於觀察期間及培養結束，檢視樣品組之每一試管是否有微生物生長。若試驗結果無微生物之發育者，判定為合格；若有證據顯示樣品組有微生物生長，綜觀試驗之環境（設備）監測、使用材料、試驗程序及陰性對照等試驗，若顯示不適或無菌操作有誤，則本試驗無效，須以原試驗檢品重新進行試驗；若有證據顯示樣品組有微生物生長，但無證據顯示本試驗無效，則判定不合格，此次實驗每一檢體均以 37°C 進行培養 14 日，標準對照菌株均呈現陽性，而每一檢體在實驗後均未檢出之病原細菌。依據《動物用藥品檢驗標準》規定不得含有任何可能檢出之病原細菌，而且每劑量中無病原性細菌不得超過 10 個。檢體分別接種 thioglycollate (TGC) 及 tryptic soy broth (TSB) 各 1 支，並充分混合均勻。將 TGC 置於 33°C，TSB 置於 22°C，培養 14 日。其間於培養後 2 日、4 日、7 日、10 日及 14 日各觀察 1 次並予記錄。觀察最終若有細菌發育嫌疑，或由於疫苗本身使培養基混濁時，應再移植於新培養基，置原溫度再培養 14 日，觀察並記錄。

真空試驗

於暗室距離 5 公釐以內以 Teslar Coil 行無極放電時，瓶內須有放電反應。

含濕度試驗

含濕度須為 4% 以下。

病毒含量試驗

取出疫苗 1 劑量 (2 mL) 作 10^{-1} - 10^{-4} 階段稀釋，將 10^{-2} - 10^{-4} 每一階段各靜脈注射於試驗用兔 4 隻，每日上、下午各量體溫 1 次，呈現兔化豬瘟病毒對試驗用兔之特殊熱反應 (雙峰性 40.5°C 以上高溫) 者認定有兔化豬瘟病毒之感染，7 天後求出每劑量之 50% 兔感染量 (RID₅₀)

假性狂犬病病毒迷入否定試驗

乾燥兔化豬瘟疫苗 20 劑量以稀釋液 40 mL 稀釋後，接種於試驗用兔 2 隻，每隻皮下各接種 5 劑量 (10 mL)，接種後觀察 14 天，接種部位不得發生假性狂犬病之皮膚搔癢症狀或反應死亡。

認定試驗

每隻試驗用兔靜脈注射 1 劑量 (2 ml)，接種 3 隻，每日上、下午各量體溫 1 次，觀察 14 天後是否呈特殊熱反應 (雙峰性 40.5°C 以上高溫)。對照組 1 隻靜脈注射稀釋液 1 劑量，另 2 隻則取已稀釋的疫苗 2 劑量與等量 1,000 倍以上豬瘟試驗用兔免疫血清混合後，置於 37°C 暖房 1 小時震盪後，靜脈注射試驗用兔 2 隻，每隻 1 劑量，每日上、下午各量體溫 1 次，觀察 14 天，須無熱反應。

結果

特性試驗

經檢測後，所有檢測樣本外觀均為粉紅色塊狀，且無異物及異常氣味。所有疫苗經稀釋後，受檢樣本均為濃度均一之粉紅色懸浮液 (表 1)。

無菌試驗

經觀察期間及培養結束，檢視樣品組均無微生物生長，所有檢體均通過無菌試驗（表 1）。

真空試驗

每一檢體均於暗室距離 5 公釐以內以 Teslar Coil 行無極放電，瓶內均有放電且有藍色光線呈現（表 1）。

含濕度試驗

每一檢體含濕度均在 4% 以下（表 1）。

病毒含量試驗

批號 2613（過期一年半）、批號 2639（過期一年）及批號 2665（過期半年）進行之實驗結果（表 1），其中批號 2639 及批號 2665 此二批次之檢體，均有呈現兔化豬瘟病毒對試驗用兔之特殊熱反應（雙峰性 40.5°C 以上高溫）（圖 1）判定為兔化豬瘟病毒之感染，而批號 2613 則否（圖 2）。

假性狂犬病病毒迷入否定試驗

所有檢體在試驗用兔皮下接種 5 倍劑量後觀察 14 天，接種部位均無假性狂犬病之皮膚搔癢症狀及死亡反應（表 1）。

認定試驗

本次實驗所使用的抗血清其中和抗體力價 $> 1 : 8192$ ，未與抗血清中和之檢體在本試驗方面均有呈現特殊熱反應（雙峰性 40.5°C 以上高溫）。與抗血清中和之對照試驗方面，三者 14 日的觀察期間均無熱反應（表 1）。

討論

在本次實驗的設計上，主要針對疫苗儲放於 4°C 環境中，依照國家檢定標準的建議品管程序就其力價衰退情況、理化性質變異與否進行分析及討論。在此次實驗中在疫苗的物理性試驗方面，均無變質之現象。顯示，本所在疫苗的製程及品管的操作基準程序是在一定的水平之上。在本次實驗室試驗，先就過期

之乾燥兔化豬瘟疫苗進行其特性試驗、真空試驗、含濕度試驗、假性狂犬病毒迷入否定試驗、認定試驗進行檢測，皆符合標準規定。在國家檢驗標準之效力試驗，是於合格之豬三頭肌肉注射豬瘟強毒毒株（ALD 株）10,000 MLD，觀察二週，均須無任何不良反應或呈輕微反應而健存；而依據本所品管實驗室以往實驗結果顯示，在每劑量含有 $10^{2.5}$ RID₅₀ 的病毒量，即可耐過 10,000 MLD 豬瘟強毒毒株之攻擊，亦即通過國家檢驗之標準。為確實瞭解經長期儲放後有效之病毒量，另進行病毒含量試驗。實驗結果顯示，在正常保存之下之乾燥兔化豬瘟疫苗，過期一年時仍保有合格之病毒力價（表 2, 3）。而從時間與效價的資料上來看，在 4°C 環境中，疫苗的病毒力價衰退狀況大約是每半年衰減 $10^{0.5}$ RID₅₀（圖 3），另從熱型變化的部份進行其圖型比對的結果發現，注射過期一年半的成品之 4 隻試驗用兔其發熱反應的平均高溫均較期限內者之兔熱平均高溫低 0.2°C。從上列實驗結果顯示，本所所產製之疫苗，在冷藏環境下，在所建議的使用期限內，仍有極佳的保護效果。而近期，本所亦積極開發新型佐劑，不僅可提升現有產品之保護效力，同時可延長製品的儲放期間，減少養豬戶在防疫上的成本。在力價下降的變化區間方面，從此次實驗的結果推測，該品項的病毒力價在現行產製的賦型劑及保護劑配方下，似乎在超過保存後的前 6 個月，其力價下降的幅度會略小於後 6 個月，而其實際下降幅度未來將再進行實驗進行分析。

乾燥兔化豬瘟疫苗之真空冷凍乾燥過程及保存性之探討，已有相當之研究報告〔1,11〕。另疫苗保護劑之研究探討，林再春等〔2〕於 1959 年進行相關試驗，在保護劑之選擇試驗中以 20% 脫脂奶粉加等量健康馬血清對兔化豬瘟病毒保存最優，故採用此方法大量製造疫苗供豬瘟防治之需。然 1970 年代為節省外匯，原使用日本製之真空瓶及橡皮栓更改為臺製，此種真空瓶及橡皮栓之品質欠佳，故有時會有真空不良，疫苗變質，且溶解性不佳等問題產生。故於 1973 年楊揚輝等〔4〕為探討病毒能長期保存且溶解性良好之保護劑，以供豬瘟疫苗製造之依據，乃參照 Kumagai〔3,10〕之方法配製 Polyvinyl Pyrrolidone

(PVP) 及乳糖為主要保護劑,結果發現以 0.3% PVP + 10%乳糖 + 0.02 mg/mL Kanamycin 者對兔化豬瘟病毒之活性保存最佳;並在冷藏室保存 18 個月後,與脫脂奶粉及健康馬血清為保護劑者可保持同等力價;且在室溫保存 6 個月或者冷藏室 559 日與製造時同樣保持良好之溶解性;且疫苗對小豬之安全性很高,經接種 50 劑量之疫苗亦未有任何反應,實驗結果顯示此保護劑具有良好之效果,藉以取代原有之保護劑。

為確保疫苗之效用,有效提升疫苗之品質與效果是有其必要性。應於豬瘟疫苗製造時,加強檢測疫苗中是否有兔出血熱、假性狂犬病病毒或其他兔源或細胞源病毒迷入或潛伏。疫苗運輸過程中,應加強抽測疫苗運輸車溫度,以維持疫苗品質。並強化豬瘟疫苗於農戶及販售點之抽測,確保疫苗能於有效期內維持有效力價;加強辦理疫苗使用宣導會,強化農民對疫苗之保存及使用知識,以維持農民能正確使用疫苗。協助養豬場建立母豬固定免疫方式,目前在臨床使用上最佳的免疫計畫可為下列兩種:

1. 種母豬完成基礎免疫後,每年一次於空胎時免疫者,其所生仔豬分別約於第 6 週齡及第 9 週齡時各免疫一次。
2. 種母豬完成基礎免疫後,於配種前免疫一次,以後不再免疫者,其所生仔豬分別約於第 3 週齡及第 6 週齡時各免疫一次。

以上述免疫計畫建立小豬移行抗體之消長,可以有效確保免疫最適當時機,達到最好之疫苗保護效果。

國內目前對於豬瘟病毒之研究已有相當之研究〔9,15,16〕,且對豬瘟疫苗的研發更不遺餘力,已利用豬腎細胞進行兔化豬瘟乾燥兔化豬瘟病毒株的培養〔6,7〕,亦以 E2 為次單位之豬瘟疫苗研發〔5,13,14〕,皆成為國內此疫苗製作之新技術。另近期國際間發生新變異之豬型流感 (H1N1) 更顯示國內對人畜共通疾病防疫的重要性,首當其衝的即為家畜用疫苗的產製。動物疫苗生產在國內多以傳統方式進行產製,而國外無論在產品力價、品質等方面均較我國優越,故國內疫苗生產之產品市場佔有率逐年降

低,再加上世界衛生組織 (WHO) 等國際化現象的興起,與國外競爭的能力日漸困難。然而國內動物疫苗量產研發技術和產業一直都有差一步 (the last mile) 的鴻溝,因此,研發生產技術的提升與相關技術平台的建立是有其必要。

豬瘟之撲滅關鍵在於落實疫苗的全面施打及落實自衛防疫與疫情通報,最終全面停止疫苗之施打。此外迅速的疫情通報系統、嚴密的監測系統,以清除受感染之豬群及豬隻,配合嚴格的移動管制、嚴禁走私,與強烈的農民配合意願,實為撲滅豬瘟之必要條件。

參考文獻

1. 林再春、楊子儒、周懋森、林仁志、陳森雄。兔化豬瘟疫苗冷凍乾燥之研究。第二報：真空冷凍過程及乾燥疫苗之保存性。臺灣畜牧獸醫學會會報 5 : 28-39 , 1961。
2. 林再春、楊子儒、周懋森、張茂林。兔化豬瘟毒冷凍乾燥之研究。臺灣畜牧獸醫學會會報 3 : 1-27 , 1959。
3. 林再春、謝竹茂、陳由昌、賴秀穗、李正雄、陳正吉、陳守仕。豬瘟 GP 組織培養疫苗之安全性及免疫效力。臺灣省畜衛試所研報 6 : 1-10 , 1969。
4. 楊揚輝、劉義雄、陳由昌、黃文徹、林進發、林正陽、林澤清、江良興、詹益波、陳守仕。兔化豬瘟疫苗乾燥劑改良試驗。臺灣省畜衛試所研報 10 : 15-30 , 1973。
5. 蔡耿宇、簡茂盛、林正忠、劉正義、李維誠。豬瘟 E2 次單位標識疫苗保護效力之評估。臺灣獸醫誌 29 : 214-222 , 2003。
6. 鍾明華、黃金城、詹益波、劉堂輝、紀長文、邱資峰、李振宗。兔化豬瘟組織培養疫苗之研製。臺灣省畜衛試所研報 24 : 33-41 , 1988。
7. 鍾明華、詹益波、紀長文、黃金城、邱資峰、李振宗、洪文凱。兔化豬瘟組織培養病毒對小豬之免疫保護力。臺灣省畜衛試所研報 25 : 49-58 , 1989。
8. Francki R I B, Fauquet C M, Kndusom DL, Brown F. Fifth report of the International committee on Taxonomy of viruses. Arch Virol (supp1.2): 223-233, 1991.
9. Huang C, Chien MS, Hu CM, Chen CW, Hsieh PC. Secreted expression of the classical swine fever virus glycoprotein E^{ms} in yeast and application to a sandwich blocking ELISA. J Virol Methods 132: 40-47, 2006.
10. Kumagai T, Shimizu T, Ikeda S, Matumoto M. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. J Immunol 87: 245-256, 1961.
11. Lin TTC, Lee RCT. An overall report on the development of a highly safe and potent lapinized hog cholera virus strain for hog cholera control in Taiwan. NSC special publication No.5: 1-44, 1981.
12. Trautwein G. Pathology and pathogenesis of the disease. In: Liess B (ed) Classical swine fever and related viral infections, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, USA, p 27-54, 1988.
13. van Gennip HG, Bouma A, van Rijn PA, Widjoatmodjo MN, Moormann RJ. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E^{ms} or E2 of CSFV. Vaccine 20: 1544-1556, 2002.
14. Widjoatmodjo MN, van Gennip HG, Bouma A, van Rijn PA, Moormann RJ. Classical swine fever virus E^{ms} deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. J Virol 74: 2973-2980, 2000.
15. Wong ML, Liu JJ, Huang C, Chen JW, Chang TJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of 3'-terminal region of classical swine virus LPC vaccine strain. Virus Genes 17: 1-6, 1998.
16. Wong ML, Peng BY, Liu JJ, Chang TJ. Cloning and sequencing full length cDNA of classical swine fever virus LPC strain. Virus Genes 23: 187-192, 2001.

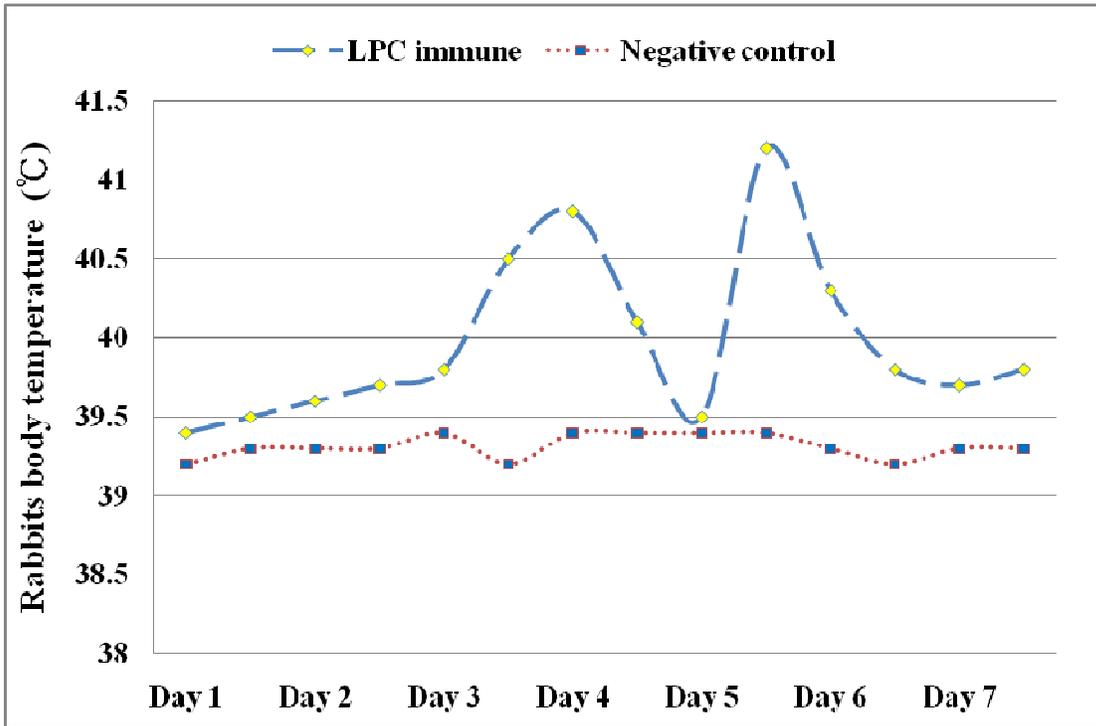


圖 1. 試驗用兔之特殊熱反應對照。

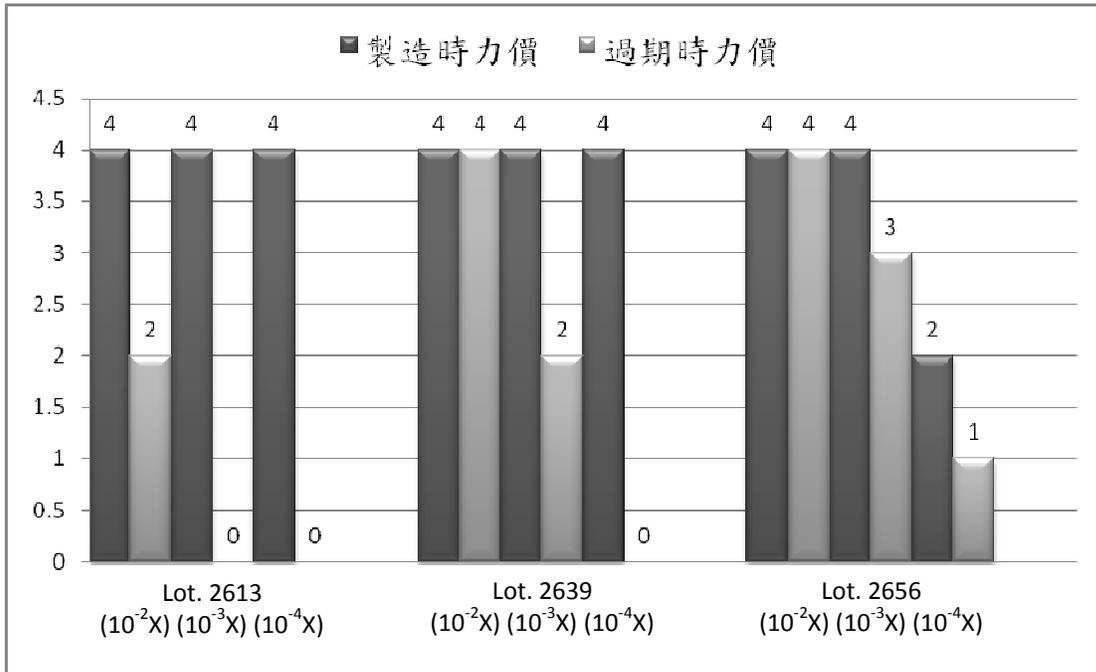


圖 2. 製造時力價 (RID₅₀) 與過期時力價對試驗用兔產生熱反應對照圖。

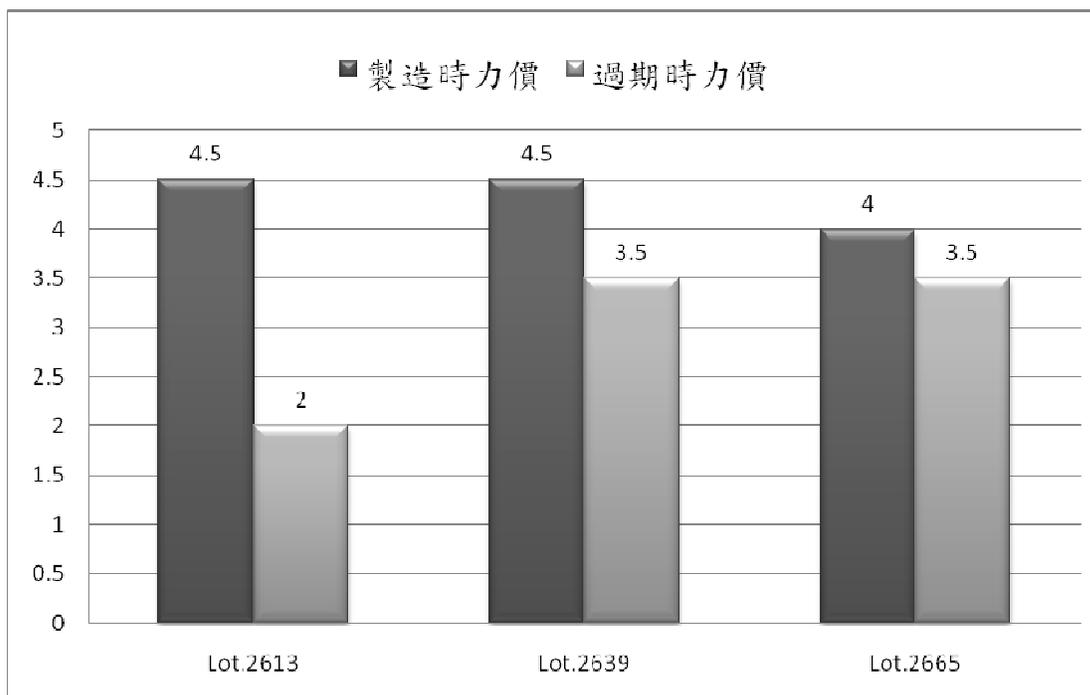


圖 3. 過期乾燥兔化豬瘟疫苗之毒含量力價對照。

表 1. 各批次檢測項目結果。

Exam. parameters	Lot. No. Lot. 2613 (Expired for 1.5 year)	Lot. 2639 (Expired for 1.0 year)	Lot. 2665 (Expired for 0.5 year)
Physical exam.	Passed	Passed	Passed
Sterility test	Passed	Passed	Passed
Vacuum test	(No clones proliferate)	(No clones proliferate)	(No clones proliferate)
Humidity test	Passed	Passed	Passed
Virus content test	Passed (3.01 %) < 10 ^{2.5} EID ₅₀	Passed (2.89 %) ≥ 10 ^{2.5} EID ₅₀	Passed (1.94 %) ≥ 10 ^{2.5} EID ₅₀
PRV contamination denied test	Passed	Passed	Passed
Recognized test	(No scratch to die)	(No scratch to die)	(No scratch to die)
	Passed	Passed	Passed

PRV: Pseudorabies virus

EID₅₀: 50% Egg infective dose

表 2. 過期乾燥兔化豬瘟疫苗病毒含量試驗之免熱反應數量。

Lot. No.	Dilution factor.	Fever rabbits numbers / Number of exam. rabbits		
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Lot. 2613 (Expired for 1.5 year)		2/4	0/4	0/4
Lot. 2639 (Expired for 1.0 year)		4/4	2/4	0/4
Lot. 2665 (Expired for 0.5 year)		4/4	3/4	1/4

表 3. 過期乾燥兔化豬瘟疫苗之病毒含量試驗。

Lot. No.	Productive titer (RID ₅₀)	Expired titer (RID ₅₀)
Lot. 2613 (Expired for 1.5 year)	10 ^{4.5}	10 ^{2.0}
Lot. 2639 (Expired for 1.0 year)	10 ^{4.5}	10 ^{3.5}
Lot. 2665 (Expired for 0.5 year)	10 ^{4.0}	10 ^{3.5}

Remark: The infected reagent of rabbit for useful LPC vaccine the least titer per individual dose should content 10^{2.5} RID₅₀

Influence of Storage on the Efficacy of Lapinized Classical Swine Fever Vaccine

C. C. Hsieh*, H. Chiang, C. H. Tseng, C. C. Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Due to the great negative impact on the industry of animal husbandry in Taiwan caused by classical swine fever, our institute has already developed the lapinized hog cholera vaccine which has proven to be efficacious. However, in order to test whether the vaccine is still effective post-expiry date, we randomly selected three batches of vaccines that were intentionally held for about 0.5 to 1.5 years in the storage unit of a Quality Control laboratory. The efficacy of these vaccines was then tested by animal experiments after storage. The results of this study indicate that vaccines stored under standard conditions are still effective even when used 1 year past the expiration date.

Keywords: *lapinized hog cholera vaccine, expiration date, efficacy*