

國內外豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準研析

張家嘉、林俊達、林琇蘋、陳炳義、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 豬黴漿菌肺炎於國內約有 30~93% 的發生率，傳染性高但死亡率低，長期慢性呼吸道疾病常造成豬隻生長速度減慢，影響上市日期，造成豬農的經濟損失。在本病的防治上，除飼料添加抗生素外，疫苗免疫亦是另一種可行的方法。本分所依據動物用藥品檢驗標準第 3 章第 6 9 節進行本疫苗逐批檢驗，但檢驗標準公告至今已近 20 年，國際間新劑型及新檢驗方法不斷開發更新，本研究簡述目前我國的檢定方法，並分析我國與歐盟、日本、美國等國家檢驗標準的差異，提供未來檢驗標準修訂的依據，期與國際接軌。

關鍵詞：豬黴漿菌肺炎、疫苗、檢驗標準

緒言

豬肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 是造成豬黴漿菌肺炎 (或稱豬地方性肺炎, Swine enzootic pneumonia; SEP) 的重要病原, 此病會造成豬隻慢性呼吸道疾病, 傳染性高但死亡率低, 常造成豬隻生長速度減慢, 進而影響豬隻的飼料換肉率[1, 8]。由於台灣地區屬亞熱帶季風氣候, 溫度與溼度非常適合豬肺炎黴漿菌的生長繁殖, 發病率約為 30~93%, 常造成豬場飼育上的困擾[2]。在本病的防治策略上, 一般是採取於飼料中添加抗生素類的藥物做為防治方法, 但長期在飼料中添加抗生素, 非但增加飼料成本, 也容易產生抗藥性菌種, 導致往後用藥上的困擾, 亦可能造成肉品中抗生素殘留等問題, 嚴重影響肉品衛生[2]。而從現場狀況可知, 就臨床而言感染過豬肺炎黴漿菌的豬隻再度遭受感染的機率較低, 顯示豬隻本身對此病原具有免疫性, 故疫苗之應用有相當程度的價值。目前國內合格上市的疫苗產品共有 15 項, 由畜衛所動物用藥品檢定分所依據「動物用藥品管理法」第 18 條[3]及「動物用藥品檢驗標準」第 3 章第 6 9 節豬黴漿菌肺炎不活化菌苗檢驗標準進行逐批檢驗[4]。惟檢驗標準公告至今已近 20

年, 國際間新劑型及新檢驗技術不斷開發更新, 為了現實所需且與國際接軌, 了解現今各國對動物用疫苗之法規並檢討我國之現行法規以追求更協同的條件便成現下重要的課題。本研究簡述目前我國的檢定方法, 並論析我國與歐盟、日本、美國等國家檢驗標準[5,6,7,9]間的差異, 提供未來本疫苗檢驗標準修訂的依據, 期與國際接軌。

材料與方法

動物用疫苗之檢驗, 不論是國內或國外, 主要針對疫苗之品質、安全性及是否達到宣稱之療效進行檢驗, 而疫苗種類包括傳統活疫 (菌) 苗、傳統不活化疫 (菌) 苗、類毒素疫苗、寄生蟲疫苗、次單位疫苗及其他基因工程技術疫苗等。檢驗項目包括特性試驗、無菌試驗、防腐劑含有量試驗、活菌數或病毒含有量試驗、安全試驗、效力試驗、力價試驗、迷入試驗 (純粹試驗)、不活化試驗等。

我國豬黴漿菌肺炎檢驗標準

明訂於動物用藥品檢驗標準第 3 章第 6 9 節, 檢驗項目包括特性試驗、無菌試驗、防腐劑含有量試驗、安全試驗及效力試驗等[4]。檢驗方法簡述如下:

一、特性試驗

須具固有理學之性狀，且無異物及異常氣味。

二、無菌試驗

不得含有任何可能檢出之活菌。

(一) 細菌否定試驗

將疫苗檢體於無菌操作台中接種於Thioglycollate (TGC) 及血液培養基 (Blood agar) 中，並取枯草桿菌 *Bacillus subtilis* (ATCC編號21778) 為陽性對照，滅菌後之磷酸緩衝液 (Phosphate-buffered saline; PBS) 為陰性對照，置於37 °C培養箱內，2至10天觀察試驗結果。

(二) 黴菌否定試驗

將疫苗檢體於無菌操作台中接種於Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 中，並取黑麴菌 *Aspergillus brasiliensis* (ATCC編號16404) 為陽性對照，滅菌後之磷酸緩衝液 (PBS) 為陰性對照，置於25 °C (室溫) 培養2至10天觀察試驗結果，如結果判定困難，可再培養於Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 培養基3至5日，觀察有無黴菌生長。

三、防腐劑含有量試驗

酚 (Phenol) 之含量須在0.5 % 以下，甲醛 (Formaldehyde) 之含量須0.5 % 以下，硫柳汞 (Thimerosal) 之含量須在0.01 % 以下。

疫苗前處理

取1 mL的待測疫苗與2 mL的10 % NaCl及3 mL的Chloroform加入15 mL離心管，充分混合均勻，於2,400 rpm離心5分鐘，取上層 (水層) 吸到新的15 mL離心管中，再加去離子水至5 mL刻度處 (下層氯仿需倒至含氯廢液桶)。另取1 mL去離子水 (Distilled deionized water; DDW) 亦做前處理作為陰性對照。

(一) 酚含有量試驗

取前處理之疫苗1 mL至新的50 mL離心管中，加去離子水至30 mL處，每一管分別加入1 mL的50 % 醋酸鈉和1 mL的硝基苯胺-亞硝酸鈉混合液 (0.3 % 硝基苯胺 (4-Nitroanilin) 與10 % 亞硝酸鈉 (Sodium nitrite) 以33.3:1比例混合)，混合均勻。加入2 mL 的10.5 % 碳酸鈉溶液後，再加去離子水

至50 mL處，混合均勻後，靜置10分鐘。取2 mL溶液置於比色管，以分光光度計550 nm波長測定吸光值。待測疫苗與酚標準液比較，酚含量須在0.5%以下。

(二) 甲醛含有量試驗

取前處理之疫苗0.1 mL至15 mL離心管中。每一管分別加入2 mL的冰醋酸-醋酸銨 (12.9%冰醋酸 (Acetic acid) 與17.34%醋酸銨 (Ammonium acetate) 以1:25比例混合，pH 6.25) 混合液，再加入2 mL的乙基丙酮-無水酒精混合液 (3.5 mL的乙基丙酮 (Acetyl acetone) 及7 mL的無水酒精 (Ethanol)，加入去離子水至500 mL)，混合均勻。置於60 °C水浴槽加熱15分鐘後再放置冷水 (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。待測疫苗與甲醛標準液比較，甲醛含量須在0.5%以下。

(三) 硫柳汞含有量試驗

取前處理之疫苗0.5 mL至50 mL離心管中，加去離子水至5 mL，於化學排煙櫃內，每一管分別加入5 mL的2 N硫酸溶液 (Sulfuric acid) 和10 mL的0.002%雙硫腺 (Dithizone) 溶液 (以四氯化碳配置)，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10 mL 的16.8%氨水溶液，激烈震盪1分鐘。靜置使液面分離，去除上層液，留下層。去除水層後，黃色下層經濾紙過濾至15 mL離心管中。取2 mL溶液置於比色管，以分光光度計480 nm 波長測定吸光值。待測疫苗與硫柳汞標準液比較，硫柳汞含量需在0.01%以下。

四、安全試驗

(一) 小鼠

選體重10~15公克健康小鼠12隻，任取2隻為對照，其餘10隻各腹腔注射待測疫苗0.5 mL，觀察2週，均須無任何不良反應而健存。

(二) 天竺鼠

選體重350公克健康天竺鼠3隻，任取1隻為對

照，其餘2隻各皮下注射待測疫苗1 mL，觀察2週，均須無任何不良反應而健存。

（三）小豬

選5週齡無特定病原（Specific pathogen free；SPF）小豬7頭，其中一頭肌肉注射待測疫苗5劑量，另4頭每頭肌肉注射待測疫苗1劑量2次，間隔2週，其餘2頭不注射作為對照，菌苗注射後觀察4週，供試驗豬隻均須無任何不良反應而健存。

五、效力試驗

（一）攻毒試驗

將前款注射1劑量2次之安全試驗小豬，於第2次注射後2週連同對照組，以每公撮含 $1.0 \sim 2.0 \times 10^8$ CCU（Color change unit）豬肺炎黴漿菌強毒菌株，行氣管內接種2 mL，經4週後，試驗豬進行病理解剖，檢查肺部之病變。對照組與免疫組豬隻之肺炎病變平均點數差，須大於或等於4.0。

（二）力價試驗

供試豬於強毒菌株攻擊前採血，檢測豬血清中對豬肺炎黴漿菌之間接血球凝集抗體。免疫組75%以上須具有16倍以上之抗體價，而對照組須均為陰性（8倍以下）。

國外豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準

一、日本

動物用生物學的製劑基準、檢定基準的疫苗類中，依豬肺炎黴漿菌的疫苗株別（strain）及佐劑配方的不同共有3項相關的檢驗標準。包括豬肺炎黴漿菌肺炎感染症（添加佐劑）不活化疫苗（檢定 *M. hyopneumoniae* 1986-1-1株或同級株）、豬肺炎黴漿菌肺炎感染症（添加羧乙烯聚合物（Carboxyvinyl polymer）佐劑）不活化疫苗（檢定 *M. hyopneumoniae* P-5722-3株或同級株）及豬肺炎黴漿菌肺炎感染症（油性添加佐劑）不活化疫苗（檢定 *M. hyopneumoniae* NL-1042株、J株、B-3745株或同級株）等。3項檢驗標準內容敘及定義、種株培養方法，疫苗製造過程，半成品以至於成品之檢驗規定，其中成品的檢驗項目包括特性試驗、pH測量試驗、無菌試驗、硫柳汞定量試驗、福馬林定量試驗、鋁定量試驗、異常毒性否定試驗、安全試驗及力價試驗等[5]。

二、歐盟

歐洲藥典（European Pharmacopoeia 7.0 volume 1）中於動物用疫苗類有新訂定豬地方性肺炎不活化疫苗（Porcine enzootic pneumonia vaccine（Inactivated））之檢驗規範。其內容包括規範疫苗之定義、製備方式、檢驗方法及成品批次檢驗等試驗方法，其中成品批次檢驗項目需包含認定試驗、無菌試驗、不活化試驗、安全及效力試驗[7]。

三、美國

美國未有明文規定之豬肺炎黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準，檢驗標準散落於美國聯邦法規（Code of Federal Regulations：Title 9 Parts 1 to 199 Animals and Animal Products, Part 113-standard）中，包括113.5的一般性試驗、113.8的批次體外檢驗法、113.26的非活菌疫苗之細菌及黴菌檢驗法、113.33的小鼠安全試驗、113.38的天竺鼠安全試驗、113.44的豬隻安全試驗及113.100的不活化菌苗之一般要求[6]等。另外獸醫服務備忘錄編號800.90（Veterinary services memorandum no. 800.90）亦有對動物用生物藥品之相對效價試驗（Relative potency）做說明及規範[9]。

結果

整理各國豬肺炎黴漿菌肺炎不活化疫苗之法源依據、成品檢驗標準名稱、適用範圍及檢驗項目結果如表1。我國的針對疫苗成品檢驗項目為特性試驗、無菌試驗、防腐劑含量試驗、安全試驗及效力試驗。日本規定之檢驗項目有特性試驗、pH測量試驗、無菌試驗、硫柳汞定量試驗、福馬林定量試驗、鋁定量試驗、異常毒性否定試驗、安全試驗及力價試驗。歐洲藥典則規定疫苗成品需執行認定試驗、無菌試驗、不活化試驗、安全及效力試驗。美國針對疫苗成品檢驗項目大致包括無菌試驗、防腐劑含有量試驗、安全試驗及相對效價試驗。

其中疫苗的一般性試驗，也就是特性試驗、無菌試驗、pH測量試驗、認定試驗及防腐劑含量試驗等，各國檢驗方法及檢驗規定雷同，主要檢驗疫苗最基本的品質。至於安全試驗部分，疫苗之安全性著重在過

量注射於動物後是否會造成局部或全身性不良反應，在我國需免疫固定劑量於小鼠、天竺鼠及無特定病原小豬後，不得有任何不良反應而健存。日本檢驗標準在安全試驗部分有兩種名稱，使用替代動物如天竺鼠、小鼠等進行過量注射檢驗，稱異常毒性否定試驗，若直接使用對象動物（小豬）進行過量注射檢驗，則稱安全試驗。各項檢驗標準依檢定疫苗產品不同，有不同規定，其中豬黴漿菌肺炎感染症（添加佐劑）不活化疫苗檢驗標準中，異常毒性否定試驗需同時進行天竺鼠及小鼠試驗，且受試動物須無不良反應而健存；而豬黴漿菌肺炎感染症〔添加羧乙烯聚合物（Carboxyvinyl polymer）佐劑〕不活化疫苗檢驗標準中，異常毒性否定試驗規定使用天竺鼠進行檢驗，而安全試驗則使用小豬進行檢驗，依疫苗特性兩者可擇一進行，但受試動物須無不良反應或增重正常。此外，豬黴漿菌肺炎感染症（油性添加佐劑）不活化疫苗檢驗標準中，異常毒性否定試驗規定使用天竺鼠、小鼠進行檢驗，而安全試驗則使用小豬進行檢驗，依疫苗特性兩者可擇一進行，但受試動物須無不良反應、增重正常及體溫正常。歐盟則規定疫苗須使用小豬進行安全性試驗。美國則依各家廠規，可選擇使用小鼠、天竺鼠或抗體陰性小豬進行疫苗安全試驗評估（詳如表2）。

而效力試驗部分，我國規定SPF小豬免疫2次後，採血檢測小豬血清中豬肺炎黴漿菌間接血球凝集抗體，並進行攻毒試驗。日本的3項檢驗標準則選用小鼠或兔子免疫後採集血清測ELISA抗體價，ELISA檢測方法則依檢驗標準內容規定進行。歐洲藥典則規定若進行攻毒試驗，攻毒株需與疫苗株不同，但也可以選擇使用小鼠或相對效價試驗取代豬隻攻毒試驗。美國則以效價試驗取代豬隻攻毒試驗，試驗方法則依各家疫苗產品特性自行開發，獲主管機關認可後則可以取代效力試驗（表3）。

討論

目前我國核准製造或輸入共15種不同品牌之豬黴漿菌肺炎不活化疫苗產品，其中國內製造者有全亞洲、大豐兩家疫苗廠之產品，國外輸入者則有英特威、

東盈、龍馬躍、卜蜂、輝瑞、建盈、信超等代理商代理相關產品，且有許多新產品陸續申請檢驗登記中。依據本分所最近3年的統計結果，黴漿菌肺炎不活化疫苗每年檢驗批數約35~45批，平均總劑量在900萬劑上下，僅次於豬瘟疫苗，顯示本疫苗市場需求量非常大。國家檢驗標準為了與國際接軌，了解現今各國對動物用疫苗之法規並檢討我國之現行法規以追求更協同的條件是非常重要的。

分析各國檢驗標準訂定的準則，日本跟我國一樣，亦採取逐批檢定，不過由於不同組成或佐劑等新劑型疫苗不斷問世，檢驗標準亦不斷增（修）訂，像豬黴漿菌肺炎不活化疫苗，依產品菌株及佐劑的不同，至少就有3種檢驗標準，每種檢驗標準雖完整規範試驗方法及步驟，但亦有許多選擇性（如：安全及效力試驗各有2種選擇等）。歐盟與美國是採大方向的規定，容許各產品依疫苗特性使用自行開發的檢驗方法進行檢驗。

再分析廠牌疫苗自家或國家檢驗報告，除國產疫苗依循目前國內檢驗標準外，國外產品如自美國進口的產品：先靈豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（M+PAC）、百靈佳豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（Ingelvac® M.hyo）、輝瑞豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（Suvaxyn RespiFend MH）、格蘭德豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（MYCO SHIELD）、徽將軍豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（SPRINTVAC MH）等，皆以相對效價試驗取代效力試驗；而自歐洲國家進口的產品如：普豬威豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（Porcilis® M Hyo）（荷蘭）、喜伯樂豬黴漿菌肺炎不活化菌苗（MYPRIVAC® SUIIS）（西班牙）等，則以小鼠或天竺鼠的ELISA抗體力價試驗，取代效力試驗；日本產品如：日生研豬黴漿菌肺炎不活化菌苗亦以小鼠免疫後之ELISA抗體力價，取代豬隻效力試驗。

依據目前國內檢驗標準之規定，檢驗一批疫苗包括一般性試驗、安全試驗及效力試驗共須耗時75天，但比較我國與其他國家的檢驗標準，一般性試驗在各國檢驗方法差異不大，而在安全試驗部分，我國則較其他國家嚴謹，需同時3種動物別（小鼠、天竺鼠及豬）均通過才合格，如此雖可更加確認疫苗之安

國內外豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準研析

全性，然而需使用較多的實驗動物，如此不但不符合動物福祉，且增加疫苗檢驗之成本。在效力試驗部分，我國檢驗豬肺炎黴漿菌特異性抗體的間接血球凝集試驗（IHA），在各國檢驗方法中已經不再使用，顯示本方法已非主流檢驗方法。此外，攻毒試驗雖是證明疫苗效力最明確的方法，但若依規施行逐批檢驗，從免疫、攻毒至最後的解剖判讀就需花費2個多月的時間，著實耗費檢驗人力及檢驗時間，故有研究修正之必要。

全球貿易日漸熱絡，國際趨勢顯示各國在制定標準或規格時，宜儘量採用國際標準為基準。目前在國

內上市使用的動物用疫苗雖能符合國內法規的要求，其查驗之重點卻未見得符合國際規定。有鑑於此，關於未來豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準的修正方向，建議在安全試驗部分，可仿照歐盟，僅以疫苗之目標動物豬隻進行安全性試驗即可；在效力試驗部分，筆者目前正邀集各家廠商提供自家的檢驗試劑及檢驗方法，先行評估相對效價試驗或替代動物力價試驗是否可以取代現行之豬隻攻毒試驗及力價試驗，並依試驗結果研擬豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準修正草案，期使本檢驗標準更符合現況，並與國際接軌。

表 1、各國豬黴漿菌肺炎不活化疫苗成品檢驗標準。

國家	法規依據	章節	檢驗標準名稱	適用範圍	檢驗項目
台灣	動物用藥品檢驗標準	第三章第69節	豬黴漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準	豬黴漿菌肺炎不活化疫苗	特性試驗
					無菌試驗
					防腐劑含有量試驗
					安全試驗
					效力試驗
日本	動物用生物學的製劑基準、檢定基準	疫苗類編號100	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（アジュバント加）不活化ワクチン 中譯名：豬黴漿菌肺炎感染症（添加佐劑）不活化疫苗	<i>M. hyopneumoniae</i> 1986-1-1株或同級株	特性試驗
					pH測量試驗
		疫苗類編號101	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン 中譯名：豬黴漿菌肺炎感染症（添加羧乙烯聚合物（Carboxyvinyl polymer）佐劑）不活化疫苗	<i>M. hyopneumoniae</i> P-5722-3株或同級株	無菌試驗
					硫柳汞(thimerosal)定量試驗
		疫苗類編號102	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン 中譯名：豬黴漿菌肺炎感染症（油性添加佐劑）不活化疫苗	<i>M. hyopneumoniae</i> NL-1042株、J株、B-3745株或同級株	福馬林(formalin)定量試驗
					鋁定量試驗
					異常毒性否定試驗
					安全試驗
					力價試驗
歐盟	歐洲藥典 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0)	動物用疫苗 (Vaccines for veterinary use)	豬地方性肺炎不活化疫苗 (PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA VACCINE (INACTIVATED))	所有豬黴漿菌肺炎不活化疫苗產品	認定試驗(Identification)
					無菌試驗
					不活化試驗(Residual live mycoplasma)
					安全試驗
					效力試驗
美國	CODE OF FEDERAL REGULATIONS : Title 9 Parts 1 to 199 Animals and Animal Products	PART 113—STANDARD REQUIREMENTS	113.5 General testing	所有豬黴漿菌肺炎不活化疫苗產品	無菌試驗
			113.8 In vitro tests for serial release		
			113.26 Detection of viable bacteria and fungi except in live vaccine		防腐劑含有量試驗
			113.33 Mouse safety tests.		
			113.38 Guinea pig safety test.		安全試驗
			113.44 Swine safety test.		
	VETERINARY SERVICES MEMORANDUM NO. 800.90		113.100 General requirements for inactivated bacterial products.		抗原含有量試驗
			Guidelines for Veterinary Biological Relative Potency Assays and Reference Preparations Based on ELISA Antigen Quantification		

表 2、各國豬微漿菌肺炎不活化疫苗成品安全試驗規格及檢驗方法。

國家	檢驗標準名稱	試驗方法	判定標準	備註
台灣	豬微漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準	1. 選體重10~15公克健康小白鼠12隻，任取2隻為對照，其餘10隻各以本劑腹腔注射0.5 mL，觀察2週。	均須無任何不良反應而健存	3項檢驗項目均須合格
		2. 選體重350公克健康天竺鼠3隻，任取1隻為對照，其餘2隻各以本劑皮下注射1 mL，觀察2週。	均須無任何不良反應而健存	
		3. 選5週齡無特定病原(SPF)小豬7頭，其中1頭肌肉注射本劑5劑量，另4頭每頭肌肉注射本劑一劑量2次，間隔2週，其餘2頭不注射作為對照，疫苗注射後觀察4週。	供試驗豬隻均須無任何不良反應而健存	
日本	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(アジュバント加)不活化ワクチン	1. 選350克之天竺鼠2隻，每隻腹腔注射5 mL，連續觀察7天。(列於異常毒性否定試驗)	均須無任何不良反應而健存	2項檢驗均須通過
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症(添加佐劑)不活化疫苗	2. 選5週齡小鼠10隻，每隻腹腔注射0.5 mL，連續觀察7天。(列於異常毒性否定試驗)	均須無任何不良反應而健存	
	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(カルボキシビニルポリマーアジュバント加)不活化ワクチン	1. 選350克之天竺鼠2隻，每隻腹腔注射0.3 mL，連續觀察7天。(列於異常毒性否定試驗)	均須無任何不良反應而健存	異常毒性否定試驗與安全試驗2項擇一進行
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症〔添加羧乙烯聚合物(Carboxyvinyl polymer)佐劑〕不活化疫苗	2. 選3~5週齡豬隻2頭，於頸部肌肉進行免疫，2週後再補強注射一次，觀察2週。(列於安全試驗)	免疫前及觀察結束後進行秤重，免疫後之體重需大於或等於免疫前之體重	
	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(油性アジュバント加)不活化ワクチン	1. 選350克之天竺鼠2隻，每隻腹腔注射5 mL，連續觀察7天。(列於異常毒性否定試驗)	均須無任何不良反應而健存	異常毒性否定試驗與安全試驗2項擇一進行
		1-2. 選5週齡小鼠10隻，每隻腹腔注射0.5 mL，連續觀察7天。(列於異常毒性否定試驗)	均須無任何不良反應而健存	
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症(油性添加佐劑)不活化疫苗	2. 選3週齡小豬2頭，第1次各肌肉注射 2 mL，並於14天後補強注射，連續觀察2週。試驗期間內，於免疫前、第一次免疫後3天、補強注射當天及觀察結束時測量體重。並於接種前一天起連續3天，每天量測直腸溫。(列於安全試驗)	1. 各階段體重須正常增重 2. 體溫無異常	
歐盟	豬地方性肺炎不活化疫苗〔PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA VACCINE (INACTIVATED)〕	選建議用量最低週齡且抗體陰性小豬2頭，每隻肌肉注射2劑量，連續觀察14天。並於免疫前、免疫後2小時及2天時量測體溫。	1. 須無不良反應而健存 2. 短暫的體溫增加不可超過2°C	
美國	113.33 Mouse safety tests.	選小鼠8隻，每隻腹腔或皮下注射0.5 mL(dose)，連續觀察7天。	均須無任何不良反應而健存	依各家廠規規定，擇1至2項進行
	113.38 Guinea pig safety test.	選天竺鼠2隻，每隻腹腔或皮下注射 2 mL(dose)，連續觀察7天。	均須無任何不良反應而健存	
	113.44 Swine safety test.	選建議用量最低週齡且抗體陰性小豬2頭，每隻肌肉注射2劑量，連續觀察21天。	均須無任何不良反應而健存	

國內外豬微漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準研析

表 3、各國豬微漿菌肺炎不活化疫苗成品效力試驗規格及檢驗方法。

國家	檢驗標準名稱	試驗方法	判定標準	備註
台灣	豬微漿菌肺炎不活化疫苗檢驗標準	1. 將前款注射1劑量2次之安全試驗小豬，於第2次注射後2週連同對照組，以每公撮含 $1.0 \sim 2.0 \times 10^8$ CCU 豬肺炎微漿菌強毒菌株，行氣管內接種2 mL，經4週後，試驗豬進行病理解剖，檢查肺部之病變。 2. 供試豬於強毒菌株攻擊前採血，檢測豬血清中對豬肺炎微漿菌之間接血球凝集抗體。	對照組與免疫組豬隻之肺炎病變平均點數差，須大於或等於4.0 免疫組75%以上須具有16倍以上之抗體價，而對照組須均為陰性(8倍以下)	2項均須合格
日本	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（アジュバント加）不活化ワクチン	1. 選6～7週齡小鼠25隻，隨機選20隻為免疫組，另5隻為對照組。免疫組免疫1.0 mL待測疫苗後，4週進行採血，將免疫組及對照組所得之血清實施 sandwich ELISA。	70%以上免疫組抗體力價必須在2,560倍以上，對照組中皆必須在320倍以下。此外，參考陽性血清抗體力價須為2,560～5,120倍	2項擇一進行
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症(添加佐劑)不活化疫苗	2. 選6～7週齡小鼠25隻，隨機選20隻為免疫組，另5隻為對照組。免疫組免疫1.0 mL待測疫苗後，4週進行採血，將免疫組及對照組所得之血清實施Indirect ELISA。	80%以上免疫組的抗體力價必須在6,400倍以上，對照組皆必須在400倍以下。參考陽性血清抗體力價須為3,200～6,400倍	
	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン	1. 選6～7週齡的ICR雌鼠50隻，隨機分為3組，分別為試驗組(20隻)、參考疫苗組(20隻)及對照組。試驗組皮下注射待測疫苗0.2 mL，參考疫苗組則皮下注射參考疫苗0.2 mL，對照組則不進行免疫。在免疫2週，採集試驗組、參考疫苗組及對照組之血清進行ELISA檢測。	試驗組的血清平均吸光度值，需大於或等於參考疫苗組的血清。再者，參考疫苗組與對照組血清的平均吸光度值差，必須大於0.4，且對照組血清的平均吸光度值必須小於0.1	2項擇一進行
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症〔添加羧乙烯聚合物(Carboxyvinyl polymer)佐劑〕不活化疫苗	2. 選6～7週齡的SPF ddY雌鼠30隻，隨機選20隻為免疫組，另10隻為對照組。免疫組皮下免疫0.1 mL的待測疫苗，免疫後3週，採集免疫組及對照組血清進行ELISA檢測。	70%以上免疫組抗體力價必須在2,560倍以上，對照組中皆必須在320倍以下。此外，參考陽性血清抗體力價須為2,560～5,120倍	
	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン	1. 選6～7週齡小鼠25隻，隨機選20隻為免疫組，另5隻為對照組。免疫組免疫1.0mL待測疫苗後，4週進行採血，將免疫組及對照組所得之血清實施 sandwich ELISA。	70%以上免疫組抗體力價必須在2,560倍以上，對照組中皆必須在320倍以下。此外，參考陽性血清需呈現2,560～5,120倍的抗體效價。	2項擇一進行
	中譯名：豬微漿菌肺炎感染症（油性添加佐劑）不活化疫苗	2. 選體重1.6～3.2kg的兔子13隻。隨機選10隻為免疫組，另3隻為對照組。對免疫組行肌肉注射1.0mL待測疫苗。免疫後6週，採集免疫組及對照組之血清進行ELISA檢測。	免疫組之抗體力價需大於參考陽性血清。對照組抗體力價皆必須在20倍以下。參考陰性血清的平均吸光值必須為0.05～0.11；參考陽性血清的抗體力價必須為40～160倍	
歐盟	豬地方性肺炎不活化疫苗〔PORCINE ENZOOTIC PNEUMONIA VACCINE (INACTIVATED)〕	1. 選20抗體陰性小豬，隨機選12隻為免疫組，8隻為對照組，依待測疫苗用法用量進行免疫，於最後一次免疫後2週，以氣管接種或噴霧方式進行攻毒(攻毒株需與疫苗株不同)。21-30天後進行將豬隻犧牲，進行肺臟病變分析。	免疫組須與對照組有顯著差異。	
		2. 選18-20克小鼠至少5隻，對照小鼠至少5隻，依適當之用法用量進行免疫，於免疫前及最後一次免疫後14-21天採集血清，使用適當的方法進行特异性抗體檢測(例如ELISA)	依廠規方式檢驗	
		3. 相對效價試驗	依廠規方式檢驗	
美國	113.8 In vitro tests for serial release veterinary services memorandum no. 800.90	相對效價試驗	依廠規方式檢驗	

參考文獻

1. 林俊宏。全球豬黴漿菌疫苗市場現況與發展趨勢。農業生技產業季刊第二十期：14~17，2009。
2. 翁仲男。豬黴漿菌性肺炎疫苗。農業生技產業季刊第六期：9~14，2006。
3. 動物用藥品管理法。行政院農業委員會公告。In: <http://law.coa.gov.tw>
4. 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>
5. 動物用生物學的製劑基準、檢定基準。日本。平成24年。
In: <http://www.maff.go.jp/nval/kijyun/index.htm>
6. Code of federal regulations, title 9-animal and animal products, Parts 101 to 123.2012.In:http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/vb_cfr.shtml.
7. Porcine enzootic pneumonia vaccine (Inactivated). In European pharmacopoeia, 7th ed., published by the European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2011.
8. Ross RF: Mycoplasma diseases. In Diseases of swine. 8 edition. Edited by: Taylor DJ. Ames, Iowa USA: Iowa State University Press; 1999:495-507.
9. VETERINARY SERVICES MEMORANDUM NO. 800.90. August 5, 1998.
In: <http://www.docstoc.com/docs/49619166/VETERINARY-SERVICES-MEMORANDUM-NO-80090>.

Comparison between Domestic and Foreign Inspection Standards of Inactivated Swine Enzootic Pneumonia Vaccine

CC Chang, CT Lin, HP Lin, PY Chen, SR Yeh, RS Chen

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

Abstract Swine enzootic pneumonia (SEP) is characterized by a high infection rate affecting 30~93% of swine herds, but with low mortality rate in Taiwan. The chronic respiratory disease infection by SEP not only decreases the growth of pigs but also causes a great economic loss in pig industry. Current strategy to prevent of SEP in Taiwan is to add antibiotic in feed, but vaccination is another option. The current inspection methods for each batch of inactivated SEP vaccine is based on the section 69 in chapter III of animal drugs inspection standards that were set nearly twenty years ago. With the rapid progress of technological development, novel formulas and new testing methods have been developed in the world. We outlined the inspection methods of inactivated SEP vaccine in Taiwan and compared these methods employed in European Union (EU), Japan, and United States. The present study provided useful information for further revising SEP vaccine inspection standards to be commutable with other national standards.

Keywords: *Swine enzootic pneumonia, vaccine, inspection standards*

