

四種白喉抗毒素馬匹免疫法之比較

劉雋湘 王扶生¹⁾ 方箭筠

(中央生物製品研究所, 北京)

各試驗室製造白喉抗毒素所用的馬匹免疫方法極不一致, 1951 年以來本所曾選擇了四種方法在四羣馬內分別試用以作比較。

免疫方法

(一) 第一法²⁾:

(1) 抗原: 白喉類毒素³⁾, 效價每毫升 25—30 絮狀反應單位(Lf), 每公升類毒素加 33% CaCl₂ 溶液 25 毫升(最後濃度約為 0.75%)。

(2) 免疫程序:

第一程: 每隔 4 日皮下注射 1 次, 第一次 20 毫升, 第二次 50 毫升, 以後每次增加 50 毫升, 至注射 5 次, 注射量達到 200—250 毫升後採血測定單位。如達每毫升 500 單位即可開始放血, 連放 2 次, 間隔 2 天。放血後休息 10 日再重新開始第二程免疫。

第二程: 仍每隔 4 日皮下注射 1 次, 第一次注射量等於第一程最後一次之注射量, 以後每次增加 50 毫升, 注射 3 次後又可再次放血, 仍連放 2 次。放血後休息 10 日再開始第三程免疫。

第三程: 方法與前同, 第一次注射量等於上一程最後一次之注射量。第三程以後即為第二程之重複循環, 直至馬匹死亡或被淘汰為止。注射量每次增加 50 毫升, 但最多注射 600 毫升即不再增加。如注射至 600 毫升效價仍不能達到放血標準則停止注射, 休息 1—2 月或即斟酌情況將馬淘汰。

1) 現在通訊處: 長春生物製品所, 長春。

2) 本所之常規方法。

3) 毒素菌種係 PW 8, Toramoto, 培養基係黃有爲氏白喉毒素培養基, *Ch. Med. J.*, 65, 145 (1947)

(二) 第二法¹⁾:

(1) 抗原：白喉類毒素，25—30 Lf/毫升，每公升加入蟻醛殺死之白喉桿菌約 20 克 (2%)。

(2) 免疫程序:

第一程：每隔 2 日皮下注射 1 次，第一次 20 毫升，第二次 50 毫升，以後每次增加 50 毫升，注射 3 次即開始採血測定效價，達到 500 單位/毫升後開始放血，放血 2 次休息 2 週，再行下一程免疫。

第二程：每隔 3 日注射 1 次，注射量為 150, 200, 250 毫升，隨時採血測定單位，如效價繼續升高或至少不見降低則可陸續放血，每月可放 2 次，每放 2 次後休息 2 週。

第三程：以後與前相同，注射量最多不超過 300 毫升。效價不能達到標準之馬匹進行長期休息或即淘汰。

(三) 第三法²⁾:

(1) 抗原：白喉類毒素，25—30 Lf/毫升。

(2) 免疫程序：每隔 4—5 日皮下注射一次，開始注射 25 毫升，第二次 35 毫升，第三次 50 毫升，第四次 100 毫升，至此即可採血測定效價，如達到 100—200 單位/毫升則表示此馬可得良好成績。注射到 200 毫升後每次增加 100 毫升，最多注射 700 毫升。血清效價達到 500 單位/毫升後即可放血，亦係連放 2 次間隔 2 天，是為第一程。放血後休息 10 日再開始第二程免疫，從上次注射之量開始每次增加 100 毫升，至 700 毫升為止。如單位不夠高可加用刺戟劑 (1% CaCl₂ 或 0.1—0.3% 明礬) 或用 “противоположные дозы” 方法：先注射 150—200 毫升，間隔 4—5 日再注射 300—400 毫升 (即第二次注射量為前一次之二倍)。

(四) 第四法³⁾:

(1) 抗原：白喉類毒素及毒素，25—30 Lf/毫升。

(2) 免疫程序:

第一程：(類毒素免疫) 每日皮下注射類毒素 1 次，每 3 天增加劑量 1 次：第 1, 2, 3 日各注射 2 毫升；第 4, 5, 6 日各 4 毫升；7, 8, 9 日各 8 毫升；

1) E. Uroma 提供資料, Report Ser. 4 # 11, 1941, Central Biologic Lab., Finland.

2) 阿巴納森科同志提供資料, 蘇聯方法。

3) 此法基本上與大連生物製品所所用者相似，但大連法開始注射量為 2, 5, 10, 20……毫升。

10, 11, 12 日各 12 毫升; 13, 14, 15 日各 20 毫升。以後每三次增加 10 毫升, 至 50 毫升後每三次增加 50 毫升; 至 150 毫升為止不再增加。注射量達到 40—50 毫升即開始採血測定單位(採血前須停止注射 5—6 日, 在注射後第 6—7 日採血)。單位到達 500 即可放血, 連放二次間隔二天。放血後休息 15 天。是為第一程。如類毒素注射至 150 毫升後仍不能達到放血標準則休息一週再開始第二程毒素免疫。

第二程: (毒素免疫)亦為每日注射一次, 但從 50 毫升毒素開始, 以後每三天增加 50 毫升, 至 150 毫升為止。放血及休息辦法與第一程相同。第二程完了仍不能達到放血效價即行淘汰。

免疫結果

第一法: 免疫馬 19 匹, 其中 16 匹免疫成功 (=84.2%) 自開始至免疫成功最短 25 天最長 76 天, 平均 35 天。在免疫成功時, 大多數馬的血清效價為 500

表 1 第一法免疫結果

馬號	性別	年齡 (歲)	來源	天然抗體* (u/ml)	免疫所需 日數	成功時效價 (u/ml)	免疫過程中達到效價 (u/ml)	
43	○	4	北京購入 免疫破傷 風失敗, 改作白喉	?	58	450	1000	
67	♀	7			25	1130	1440	
72	○	7			25	560	1035	
81	♀	9			25	1130	1330	
91	○	8			34	1190	1800	
120	○	9	自內蒙購入, 曾免 疫破傷風 失敗	曾作基礎 免疫, 正 式免疫前 測定抗體 均為 $>1/10$	25	950	1450	
122	○	8			25	450	2400	
132	♀	6			34	438	1800	
138	♀	12			25	577	2070	
144	○	8			34	450	1000	
160	♀	7			$<1/100$	45	500	950
165	♀	6			$<1/100$		未成功	
173	○	8	$>1/10$	34	1180	2400		
197	○	12	$>1/100$	25	600	800		
200	○	7	自張家口 購入	$<1/100$		未成功		
201	○	10		$>1/100$	25	425	1200	
203	○	12		$<1/100$	45	1035	1810	
206	○	12		$<1/100$		未成功		
215	○	8		$>1/10$	76	960	1450	

*天然抗體採指馬匹在開始免疫前血中所含之白喉抗毒素; ? 未經測定; (u/ml) 單位/毫升, ♀ 雌性, ○ 驢馬, > 大於, < 小於。

單位/毫升上下，但一般的在免疫過程中均逐漸上升，有 14 匹馬（88%）達到 1000 單位/毫升以上，6 匹（38%）超過 1800 單位/毫升，見表 1。

第二法：免疫馬 24 匹。成功 20 匹（83.3%），免疫所需時間最短 13 天最長 65 天，平均 32 天。在剛免疫成功時約半數的馬效價在 500 單位左右，其餘半數均遠超過 500。在免疫過程中單位超過 1000 者有 10 匹（50%），超過 1800 者 3 匹（15%）。詳見表 2：

表 2 第二法免疫結果

馬號	性別	年齡 (歲)	來源	天然抗體 (u/ml)	免疫所需 日數	成功時效價 (u/ml)	免疫過程中達到效價 (u/ml)	
103	♀	6	北京購入	?	30	915	1300	
159	○	7		$>^1/100$	15	517	888	
161	○	12		$>^1/10$	17	865	1815	
166	○	7		$<^1/100$		未成功		
169	○	6		$<^1/100$		未成功		
175	○	8		$>^1/100$	21	500	1450	
179	○	9		$>^1/10$	13	1075	1075	
182	○	8		$>^1/10$	14	810	1208	
207	○	12		$<^1/100$	90	700	700	
212	○	12		$<^1/10$	20	1812	1812	
214	○	8		$<^1/100$	23	517	604	
217	○	12		$<^1/100$		未成功		
222	○	8		張家口購入	$<^1/100$	65	1000	1000
223	○	6			$<^1/100$		未成功	
224	○	11	$<^1/100$		65	470	634	
225	♂	5	$<^1/100$		64	666	750	
226	○	8			92	471	471	
227	○	7			29	457	687	
228	♀	11			23	580	888	
229	○	8			23	725	2000	
230	○	8			23	444	916	
231	○	8			23	800	800	
232	○	7		23	888	1650		
233	○	8		23	444	1140		

♀ 雌，♂ 雄，○ 騾馬，? 未測定天然抗體。

第三法：共免疫馬 13 匹，成功 10 匹（77%），免疫所需時間為 25—63 天，平均 40 天。初成功時大部分馬的效價在 500 單位/毫升左右，以後在免疫過程中上升超過 1000 單位者 4 匹（40%），超過 1500 者 2 匹（20%），無超過 1800 者。詳見表 3：

表3 第三法 免疫結果

馬號	性別	年齡 (歲)	來源	天然抗體 (u/ml)	免疫所需 日數	成功時效價 (u/ml)	免疫過程中達到效價 (u/ml)
234	♀	9	張家口購入	$<1/100$	29	533	800
235	○	9		$<1/100$	61	500	687
236	○	10		$<1/100$	61	1142	1142
237	○	10		$<1/100$		未成功	
238	○	7		$<1/100$		未成功	
239	○	10		$>1/100$	25	457	1500
240	○	9		$>1/100$		未成功	
241	○	9		$>1/100$	28	800	1500
243	♂	?		$>1/10$	28	1066	1066
244	○	12		$>1/10$	61	800	800
245	○	10		$>1/10$	28	533	687
246	○	9		$>1^*$	63	550	550
247	○	6		$>1^*$	25	800	800

註：♀ 雌，○ 騾馬，* 結果可疑，家兔皮內法測定單位時對照反應不正常。

第四法：共免疫馬 19 匹，成功 13 匹（68%），免疫需 20—56 天，平均 47 天。初成功時單位大多數在 500 左右，以後上升不多，達到 1000 以上者僅 5 匹（38%），超過 1800 者僅 1 匹。詳見表 4：

表4 第四法 免疫結果

馬號	性別	年齡 (歲)	來源	天然抗體 (u/ml)	免疫所需 日數	成功時效價 (u/ml)	免疫過程中達到效價 (u/ml)
115	♀	12	購自內蒙	$>1/10$	55	1035	1100
142	♀	5		$<1/100$	55	1450	1450
147	○	4		$>1/10$	55	1208	1208
151	♀	12		$>1/10$	54	557	900
154	♀	10		$>1/10$	52	2071	2071
157	○	12		$<1/100$		未成功	
158	♀	12		$>1/100$		未成功	
163	♀	5		$>1/10$	20	1080	1080
164	○	8		$<1/100$		未成功	
178	♀	10		$<1/100$		未成功	
186	○	9	購自張家口	$* >1/100$	28	650	650
187	♀	5		$* >1/100$	45	650	888
193	○	12		$<1/100$		未成功	
194	○	8		$* >1/100$	45	650	650
196	♀	12		$<1/100$		未成功	
198	♀	8		$<1/100$	56	557	600
202	○	7		$* >1/100$	48	604	750
209	○	6		$<1/100$	56	483	557
216	♀	12		$<1/100$		未成功	

♀ 雌，○ 騾，* 天然抗體 $>1/100$ u/ml 係根據二次小量注射後抗毒素效價上升達到 20—50 u/ml 推測，此四匹馬之天然抗體直接測定未得結果。

比較四個方法所得結果綜合如表 5：

表 5 四種免疫方法之比較

方 法	免疫成功率 (%)			免疫成功所需時間(天)			平 均 效 價		注射後反應
	天然抗體 陽 性 馬	天然抗體 陰 性 馬	共 計	天然抗體 陽 性 馬	天然抗體 陰 性 馬	全 部 馬 匹	>1000u/ml 之馬的 %	>1800u/ml 之馬的 %	
第一法	100	40	84	*	*	25—76 (平均35)	88	38	平常
第二法	100	55	83	13—21 (平均16)	64—90 (平均71)	13—65 (平均35)	50	15	強烈局部及 全身反應
第三法	88	60	77	25—63 (平均37)	29—61 (平均44)	25—63 (平均41)	40	20	平常
第四法	90	33	68	20—54 (平均45)	55—56 (平均56)	20—56 (平均45)	33	8	平常

*一部分舊有馬匹，天然抗體不確定，不便統計。

由此可以得出以下結論：

1. 第一法免疫結果無論在免疫成功率上或血清效價上均較其他方法為高。
2. 第二法免疫結果與第一法無大區別，但注射菌體後一般馬匹均呈強度反應，有的十分嚴重，注射局部產生膿瘍，一般健康減退，瘦弱無神。故對馬匹之壽命顯有很大的損害，在一般情況下不宜長期使用此法。但其優點為免疫所需時間較短，此點在有天然抗體之馬中更為顯著（在有天然抗體之馬中免疫成功只須 13—21 天，平均 16 天）。
3. 第三法結果不如前二法成功。
4. 第四法在我們手中也不甚成功，而且在施行時引起許多不便，每天注射非常浪費人力。
5. 馬匹有無天然抗體為免疫結果好壞之決定因素，如僅選用有天然抗體之馬匹，則無論用四個方法的任何一個免疫成功率均在 88% 以上，用第一及第二法均達到 100%，而且免疫所需時間大為縮短。

討 論 與 總 結

(一) 四種免疫方法以第一法為最適用，但如將第一及第二法配合應用可能結果更佳。我們可以先用加菌體的類毒素開始注射，可以在短期內免疫成功，待免疫成功後即改用第一法，則可能既縮短免疫時間又提高成功率，而且不致縮短

馬匹的壽命。

(二) Glenny, Pope, Ramon 及許多其他學者^[1-10]均曾證明天然抗體與基礎免疫對於免疫馬匹之重要。本文也清楚的指明了此點。如果我們在開始免疫之前先將馬匹經過慎密的選擇，則免疫結果的成功是會有極好的保證的。

參 考 文 獻

- [1] Glenny, A. T. and Südmerson, H. J., *J. Hyg., Camb.*, 1921, **20**, 176.
 [2] Copeman, S. M., O'Brien, R. A., Eagleton, A. V. and Glenny, A. T., *Brit. J. Exp. Path.*, 1922, **3**, 42.
 [3] Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H. and Wallace, U., *J. Path. and Bact.*, 1925, **28**, 481.
 [4] Glenny, A. T., *J. Hyg., Camb.*, 1925, **24**, 301.
 [5] Glenny, A. T. and Llewellyn-Jones, M., *J. Path. and Bact.*, 1931, **34**, 110.
 [6] Ramon, G., *Ann. Inst. Past.*, 1931, **47**, 339.
 [7] Marvell, D. M. and Parish, H. J., *Brit. Med. J.*, 1940, **2**, 891.
 [8] Barr, M. and Glenny, A. T., *J. Hyg., Camb.* 1945, **20**, 135.
 [9] Barr, M., *Brit. J. Exp. Path.*, 1950, **31**, 615.
 [10] Barr, M., *J. Path. and Bact.*, 1951, **63**, 557.

THE COMPARISON OF FOUR HORSE IMMUNIZATION SCHEDULES FOR DIPHTHERIA ANTITOXIN PRODUCTION

LIU, C. H., WONG, F. S.* and FANG, C. Y.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

1. Four immunization schedules for diphtheria antitoxin production have been compared in 4 groups of horses. In the first schedule horses were injected subcutaneously every 5 days with increasing doses of toxoid containing 0.75% CaCl₂ as adjuvant. In the second schedule ca. 2% formalin-killed diphtheria bacilli was added in the toxoid, and horses were injected every 3 days. The third schedule was similar to the first but plain toxoid without CaCl₂ was used. The fourth schedule consisted of daily subcutaneous injection of increasing doses of plain toxoid in the primary course and still daily injections of toxin in the second course and thereafter. The maximum dose was 150 ml. toxin.

In our hand, the first schedule has been proved most satisfactory. Of the 19 horses

immunized 16 reached a titre of over 500 U/ml, 14 over 1,000 and 6 over 1,800 U/ml.

The second schedule was about as effective as the first, but it had the disadvantage of inducing serious reactions, both locally and generally.

2. The natural or basic immunity of the horses before hyperimmunization is of paramount importance. All the horses with a titre of over 1/100 U/ml before hyperimmunization have been proved good responders. Furthermore, horses with natural immunity responded especially well to the second schedule. After injection they reached the bleeding titre in only 13-21 (average 16) days.

It has been suggested that best result might be obtained if horses with natural immunity only were selected and if they were injected with toxoid with killed bacilli at the start and followed by the second schedule as soon as the bleeding titre has been reached.