

美國進口水禽雷氏桿菌症活毒及不活化菌苗安全與效力評估

喻昭芳*、黃天祥、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 本報告係防檢局委託本所進口美國康乃爾大學鴨病研究中心商品化水禽雷氏桿菌症（第1、2和5型）活毒與不活化菌苗測試，並評估是否適合於普遍感染本病的台灣水禽場使用。取得菌苗後隨即進行各項試驗，結果顯示鴨（鵝）噴霧活毒菌苗與注射不活化菌苗後，除了1隻噴霧10倍劑量SPF番鴨死亡外，其餘皆無不良反應健康存活，剖檢臟器亦無出現肉眼病變。免疫活毒菌苗（1LV）後攻毒第1和2型菌，對SPF番鴨具保護效果，但對來自污染場的北京鴨則缺乏。北京鴨免疫活毒搭配不活化菌苗（1LV+2KV），以及單用不活化菌苗（2KV）兩種免疫模式攻毒後，鴨隻對第1和2型菌攻毒均具滿意保護效力，且兩者間並無顯著差異。活毒菌苗噴霧免疫SPF番鴨（1LV）後攻毒台灣常見其他血清型菌，結果發現對第6和17型不具任何保護作用，但對第9型有微弱交叉保護。活毒搭配不活化菌苗（2LV+1KV）於田間北京鴨場與白羅曼鵝場測試，結果顯示兩場動物對第2型菌攻毒均具滿意保護效果，而第1型保護力在該場鴨隻無法評估，對鵝隻則具保護效力，但不論鴨或鵝隻攻毒第5型菌後皆保護不良。污染場北京鴨單用活毒菌苗經實驗室（1LV）與田間（2LV）測試，對3種血清型均不具任何保護效果。

關鍵詞：水禽雷氏桿菌症、活毒菌苗、不活化菌苗、安全試驗、田間試驗、交叉保護

緒言

由*Riemerella anatipestifer* (RA) 引起的水禽雷氏桿菌症為台灣重要的水禽傳染性疾病，鴨和鵝在1~8週齡時對本病最具感受性，主要引起病禽敗血症、全身性漿膜炎、恢復禽隻生長遲緩及不合格屠體增加[11]，不良的飼養環境及其他疾病併發皆會造成本病的爆發，發病率可由5~75%[3]，發病場常一再發病，且清除不易而重複發生，造成業者經濟損失[11]，故發展有效菌苗防疫為一必然趨勢。

本菌的血清型別複雜，目前共有21種血清型[3,20]，Loh及張等人發現第5與第2和第9型間；第12與6和16型間；第13與17型間；以及第17與第2和13型間具微弱交叉反應，其餘之間皆無交叉保護

力[5,6,18,21]，而造成預防上的困難。免疫最理想的方式是突破血清型別的限制，找出可產生保護力之致病或毒力因子來開發菌苗防疫[7]，目前雖有本菌相關毒力因子的報告[8,14,23]，但病原的致病機轉仍不明，國內亦缺乏快速檢測試劑與商業化疫苗[2]，所以現階段施打有效的多血清型多價菌苗，應是最佳的防治方式與暫時解決的方法。

2007年本所已選定臺灣流行之第1、2和6血清型菌株開發3價不活化菌苗[12]，其經過重複試驗與田間水禽場測試，顯示不論使用於北京鴨、番鴨或白羅曼鵝，本菌苗均具滿意保護效果且安全性極佳[10]。本所已向本會動植物防疫檢疫局（防檢局）提出新藥製造許可證申請，目前正在委託試驗進行中，

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

且本所已技術轉移民營生物製劑廠，取得許可證後即可量產供應農戶，解決水禽養殖業對本病菌苗的急迫需求，同時亦可有效降低飼養過程中抗生素的使用，造福水禽產業與增加鴨（鵝）肉品食用安全性。

礙於國內尚無本病商品化菌苗供田間水禽場防疫使用，不活化菌苗的使用雖具良好免疫效力與安全性[4,17,19]，但對不同血清型菌則仍缺乏或僅具微弱交叉保護[18,21]。有鑑於此，防檢局於2009年11月委託本所自美國康乃爾大學鴨病研究中心（Duck Research Laboratory）進口第1、2和5型活毒與不活化商品化菌苗[22]，並評估與測試此兩種菌苗是否適於台灣水禽場使用，以及活毒菌苗對他種血清型是否具交叉保護性。

本所購入美國進口菌苗後著手開始進行，並已先後完成下列各項試驗，活毒菌苗部份包含：SPF番鴨、北京鴨與白羅曼鵝安全試驗；SPF番鴨與北京鴨效力試驗；活毒搭配不活化菌苗、以及單用不活化菌苗對北京鴨效力比較測試；活毒菌苗對他種血清型交叉保護測試；單用活毒菌苗、與活毒搭配不活化菌苗應用田間水禽場北京鴨與白羅曼鵝測試。不活化菌苗方面則進行對北京鴨安全與效力試驗。

材料與方法

菌苗來源

本所自美國康乃爾大學鴨病研究中心（Duck Research Laboratory, Cornell University；DRL）採購一批包含本病第1、2和5血清型商品化活毒菌苗10萬劑與不活化菌苗9.8萬劑。

ELISA 檢測本病血清抗體

血清學檢驗本病抗體方面，參考Hatfield及劉等人之方法[11,15]，材料與方法詳述於本所43期研究報告[9]。所有血清樣本均以coating本所自製第2型RA菌超音波處理裂解抗原進行檢測，惟活毒菌苗對SPF番鴨效力試驗過程取得之血清，除coating上述抗原檢測抗體外，另外使用取自美方活毒菌苗中的活菌製成coating抗原進行檢測。陽性標準為高度免疫SPF番鴨後的血清，陰性標準則是SPF番鴨血清。

PCR 檢測 RA 菌特異性核酸

將分離之RA菌以100℃、10分鐘煮沸法處理，作為PCR之DNA模板，特異性引子為F-5'-CAGCTTAACTGTAGAACTGC-3'；R-5'-TCGAGATTTGCATCACTTCG-3'，於PCR反應溫控儀進行反應，條件為94℃、3分鐘後，進行94℃、30秒、50℃、30秒、72℃、1分鐘共35個循環，最後72℃、7分鐘。PCR產物以2%瓊膠電泳分析，產物大小應為665bp後，並與NCBI基因庫核酸序列進行比對，確認為RA菌。

活毒菌苗對 SPF 番鴨、北京鴨與白羅曼鵝安全試驗

選擇對本病具高感受性的3種鴨鵝：來自乾淨場的SPF番鴨，以及污染場北京鴨與白羅曼鵝進行測試。使用噴霧與口服兩種途徑給予本商品化活毒菌苗，每種方式分別給予1劑量與10劑量，每組6~10隻動物，SPF番鴨僅進行噴霧給予。3種鴨（鵝）1日齡時給予活毒菌苗後，免疫前、以及免疫後至2週齡期間隔3~7日，每次2~5隻鴨進行下列各項試驗：咽喉頭與泄殖腔採樣培養後進行PCR檢測RA菌特異性核酸、剖檢鴨（鵝）觀察肉眼病變並進行臟器分離RA菌，以及使用ELISA檢測血清抗體等試驗，惟白羅曼鵝缺少咽喉頭與泄殖腔採樣試驗。

活毒菌苗對 SPF 番鴨與北京鴨效力試驗（1LV：活毒菌苗免疫一次）

活毒菌苗依仿單所載用法用量分別噴霧給予乾淨場SPF番鴨30隻與污染場北京鴨45隻，免疫組與對照組分開飼養，同時兩組鴨隻於免疫前及免疫後隔週採血檢測抗體，屆4週齡時以本所自台灣田間分離的第1、2血清型和第1、2和5血清型菌株各分2~4階段濃度菌液於眼窩下竇分別注射攻毒SPF番鴨與北京鴨各兩組動物，之後參考我國動物用藥品檢定標準中以Behrens-Karber法分別計算3種血清型兩組動物的LD₅₀，最後再以免疫群LD₅₀除以對照群LD₅₀得到LD₅₀防禦指數，並參考檢驗標準中他種不活化菌苗效力試驗標準設定LD₅₀防禦指數≥10^{0.50}為評估準則[1]。

活毒搭配不活化菌苗、與單用不活化菌苗對北京鴨效力比較測試（1LV+2KV：活毒菌苗免疫一次後補強免疫不活化菌苗兩次、

2KV：不活化菌苗免疫兩次)

依仿單建議以活毒菌苗噴霧1日齡污染場北京鴨45隻，於2和3週齡時皮下注射補強不活化菌苗的活毒菌苗搭配不活化菌苗組，另一組僅於2和3週齡注射不活化菌苗45隻鴨隻的單用不活化菌苗組，兩組免疫組與對照組分開飼養，同樣於免疫前與免疫後隔週採血以ELISA檢測抗體，屆4週齡時同樣以3種血清型各分2~4階段濃度菌液肌肉注射攻毒3組鴨隻，之後同上法計算出LD₅₀防禦指數，並評估與比較兩種免疫模式對鴨隻保護效力的差異。

活毒菌苗對他種血清型交叉保護測試

將包含第1、2和5型活毒菌苗噴霧給予1日齡SPF番鴨45隻後，與對照組45隻分開飼養，於4週齡時分別眼窩下竇注射攻毒台灣常分離的第6、9與17型RA菌，同上方法分別計算對第6、9和17型的LD₅₀防禦指數，並評估活毒菌苗對這3種不同型別是否具交叉保護力。

單用活毒菌苗、與活毒搭配不活化菌苗應用田間水禽場北京鴨與白羅曼鵝測試

1. 北京鴨（櫻桃鴨）場-三星鄉新建鴨舍（2LV：活毒菌苗免疫兩次）：

實驗室測試完成後開始進行田間應用測試，於鴨隻1日齡與1週齡時基礎與補強噴霧免疫1次，免疫組與對照組各500和2,000隻分開飼養，於4週齡時帶回兩組各45隻鴨後由眼窩下竇分別攻毒第1、2和5型菌，再分別計算出3種血清型之LD₅₀防禦指數以供評估效力。與此同時，於免疫前到8週齡期間隔週對免疫與對照組鴨隻咽喉頭與泄殖腔拭子培養後進行PCR檢測、量測體重、以ELISA檢測血清抗體、剖檢觀察本病肉眼病變、與臟器分離RA菌等試驗。

2. 北京鴨場-斗六市污染場（2LV+1KV：活毒菌苗免疫兩次後補強免疫不活化菌苗一次）：

鴨隻同三星鄉鴨場於第1日與1週齡時噴霧免疫活毒菌苗約6,000隻，對照組約1,000隻間隔飼養，另於2週齡時補強注射不活化菌苗，屆4週齡時以3種同型菌肌肉注射攻毒帶回的兩組各45隻鴨後評估菌苗效力，免疫組與對照組鴨隻於8週齡前亦同第1場進行咽喉頭、泄殖腔採樣、量測體重、採血、

剖檢與臟器分離RA菌等。

3. 白羅曼鵝場-四湖鄉污染場（2LV+1KV）：

免疫時程與實驗採材等與斗六市鴨場相同，免疫組與對照組雞鵝約1,200與200隻隔開飼養。

不活化菌苗對北京鴨安全與效力試驗

污染場北京鴨每組10隻於2週齡時分別皮下注射1和5劑量不活化菌苗，免疫後觀察2週。另依仿單建議於鴨隻第2和3週齡時基礎與補強注射不活化菌苗45隻，另45隻供作對照，屆4週齡同樣使用3種同型菌株分別肌肉注射攻毒後計算3種血清型的LD₅₀防禦指數。

結果

活毒菌苗對 SPF 番鴨、北京鴨與白羅曼鵝安全試驗

以口服與噴霧兩種方式分別各給予1日齡SPF番鴨、北京鴨和白羅曼鵝1劑量及10倍劑量活毒菌苗，2週觀察期間除了SPF番鴨10倍劑量噴霧組1隻死亡外（1/6），其餘鴨（鵝）均無不良反應健康存活。番鴨免疫前喉拭與肛拭培養PCR均為陰性反應（喉：0/2；肛：0/2），噴霧免疫後14日內喉拭皆呈陽性（噴霧1劑：6/6；噴霧10劑：5/5），而肛拭仍維持陰性。污染場北京鴨喉拭免疫前已呈陽性反應（5/5），免疫後部分為陽性（噴霧1劑：1/10；噴霧10劑：1/10；口服1劑：3/9；口服10劑：3/9），而肛拭免疫前免疫後皆為陰性反應。番鴨血清抗體免疫前與免疫後2週皆為陰性，北京鴨免疫前已呈陽性（5/5），免疫後部分為陽性（噴霧10劑：2/10；口服1劑：2/10；口服10劑：2/10），污染場鵝隻與北京鴨相似，免疫前抗體亦已呈陽性（5/5），免疫後除1隻口服10倍劑量組（1/10）為陽性，其餘為陰性反應。結束觀察後鴨（鵝）隻剖檢，均無出現本症心包炎、肝包炎等肉眼病變，但於噴霧10劑量組1隻番鴨氣管內（1/6），以及口服10劑量組1隻鵝隻肺臟中（1/5）可分離出本菌。

活毒菌苗對 SPF 番鴨與北京鴨效力試驗（1LV）

活毒菌苗噴霧給予1日齡SPF番鴨後分別攻毒第

1和2血清型，其LD₅₀防禦指數分別為10^{0.91}和10^{1.67}（表1），顯示單用活毒菌苗給予乾淨鴨隻後對同型菌攻擊具良好保護效果。但單用活毒菌苗於同日齡同樣給予污染場北京鴨後分別攻毒第1、2和第5型菌，結果對這3型均不具任何保護效力（表2）。番鴨免疫前到4週齡期間，免疫與對照組鴨隻血清抗體均無出現上升（圖1），而北京鴨免疫組與對照組鴨隻免疫前即已出現移行抗體，兩組的抗體皆於2週齡時消退，至4週齡時兩組抗體力價仍未出現爬昇情形（圖2）。

活毒搭配不活化菌苗、與單用不活化菌苗對北京鴨效力比較測試（1LV+2KV、2KV）

污染場北京鴨噴霧免疫活毒菌苗1次加補強2次不活化菌苗，結果發現攻毒3種同型菌後，對第1、第2與第5型的LD₅₀防禦指數分別為10^{4.54}、10^{3.50}、10^{-0.11}，顯示除第5型外，具滿意保護效果。另一組污染場北京鴨注射2次不活化菌苗後攻毒，其3種血清型的LD₅₀防禦指數依序為10^{4.67}、10^{3.17}與10^{-0.11}，同樣對第1和2型菌出現滿意保護力且對第5型無保護力（表3）。由上述結果可知，兩種免疫模式間並無明顯差異。

活毒菌苗對他種血清型交叉保護測試

將包含第1、2和5血清型活毒菌苗噴霧免疫1日齡SPF番鴨後分別攻毒台灣常見第6、9和17型菌，3種血清型的LD₅₀防禦指數為10^{-0.33}、10^{0.58}與10^{-0.38}，活毒菌苗對第6和17型不具任何保護作用，但對第9型顯示具微弱交叉保護性。

單用活毒菌苗、與活毒搭配不活化菌苗應用田間水禽場北京鴨與白羅曼鵝測試

1. 北京鴨（櫻桃鴨）場-三星鄉新建鴨舍（2LV）：

鴨隻在1日齡和1週齡時噴霧免疫活毒菌苗，4週齡帶回本所攻毒，結果顯示單用活毒菌苗對3種血清型均不具任何保護效力（表4）。免疫前到8週齡期間，免疫與對照組鴨隻血清抗體無明顯差異（圖4），免疫前皆具移行抗體，同樣於2週齡時消退，之後至8週齡屠宰前處於本病污染場環境下飼養致抗體力價逐漸上升，未免疫對照組亦出現高抗體情形。兩組體重無明顯差異（P>0.05）（圖5），亦無發現肉眼

剖檢病變。但可於4週齡免疫組鴨隻（1/3）氣管、肺臟與肝臟，與4週齡對照組鴨隻（1/3）氣囊分離出RA菌，以及於6週齡對照組鴨隻（1/2）心血、肝臟、肺臟、氣囊、氣管與腦分離出RA菌，經血清平板凝集檢測後發現分別為第14、7和非1~21型，皆不屬於第1、2或第5型菌。

2. 北京鴨場-斗六市污染場（2LV+1KV）：

使用活毒菌苗噴霧於1日和1週齡田間水禽場北京鴨，於2週齡時皮下注射不活化菌苗，屆4週齡時將鴨隻帶回所內攻毒。結果顯示攻毒第1型菌後免疫與對照組皆無法引起過半死亡，因此無法評估菌苗對第1型的效力，對第2型菌攻毒後LD₅₀防禦指數為10^{3.76}，具滿意保護效果，但對第5型菌攻毒的LD₅₀防禦指數為10^{0.34}，顯示不具足夠效力（表5）。免疫前到8週齡期間，免疫與對照組血清抗體及鴨隻增重同上述三星場北京鴨皆無明顯差異（圖6、7），也無發現肉眼剖檢病變，但同樣可由6週齡免疫組鴨隻（1/2）氣管與肺臟，以及6週齡對照組鴨隻（1/2）肺臟分離出RA菌，經血清平板凝集測試，1株可與第4、7、8、13、14、19、20型免高免血清反應，1株可與第4和13型呈凝集反應，來自對照組的RA菌株可同時與第3、4、6、7、8、13、14、17、19和21型免高免血清反應，這些RA分離菌株亦非第1、2或第5型菌。

3. 白羅曼鵝場-四湖鄉污染場（2LV+1KV）：

活毒搭配不活化菌苗於田間白羅曼鵝場測試，結果發現鵝隻攻毒第1和2型菌後LD₅₀防禦指數分別為10^{0.5}和10^{3.69}，對第5型為10⁰，此與上述兩間水禽場結果相同，皆缺乏對第5型保護。免疫前到8週齡期間，免疫與對照組血清抗體及鵝隻增重與前兩場相似，皆無出現明顯差異，也無出現任何本病肉眼剖檢病變和分離出本菌。

不活化菌苗對北京鴨安全與效力試驗

污染場北京鴨分別皮下注射1和5劑量不活化菌苗後，所有鴨隻均無不良反應健康存活。鴨隻於2和3週齡時注射不活化菌苗2次，攻毒3種血清型菌後LD₅₀防禦指數為10^{4.67}、10^{3.17}與10^{-0.11}，顯示單用不活化菌苗對第1和2型具滿意保護力，同樣對第5型

缺乏保護力。

討論

本次評估測試的活毒菌苗在國內為首次使用，如同其他種活毒菌苗，亦有出現毒力迴歸造成動物發病之疑慮，以及動物免疫後排毒污染環境等問題，活毒菌苗給予方式為鼻腔噴霧給予，噴霧後鴨（鵝）極有可能口服食入，因此本次安全試驗除噴霧方式外，另增加口服給予方式進行測試，同時亦進行注射不活化菌苗的安全性測試。結果顯示該進口活毒菌苗與不活化菌苗的使用對鴨（鵝）安全性無虞。

活毒菌苗噴霧SPF番鴨後分別攻毒第1和第2血清型菌，其效力試驗LD₅₀防禦指數成績皆可達到本所自訂 $\geq 10^{0.50}$ 的檢定標準，顯示僅單用活毒菌苗給予乾淨鴨隻後對同型菌攻擊可具有良好保護效果，但污染場北京鴨給予活毒菌苗後分別攻毒第1、2和第5型菌，對這3型菌卻不具任何保護效力，此可能因活毒菌苗與污染場鴨隻體內存有的移行抗體中和，導致無法發揮免疫效果，此與美方推薦活毒菌苗僅適用清淨場而非污染場的結果一致。

番鴨免疫前到4週齡期間，免疫組與對照組鴨隻檢測血清抗體，無論以本所RA或美方RA菌作為抗原，其抗體力價均無出現上升情形，但免疫組卻可耐過攻毒，其對鴨隻形成的保護應來自細胞免疫反應，而非單靠體液免疫；或者活毒菌苗噴霧給予動物後，在鴨（鵝）體內可能僅產生黏膜抗體而非血清抗體，致無法檢出血清ELISA抗體，且此黏膜抗體的產生可能因此對後續眼窩下竇攻毒時對鴨隻形成保護耐過發病。而免疫組與對照組北京鴨免疫前即已出現移行抗體，兩組的抗體皆於2週齡時消退，但至4週齡時兩組抗體力價仍無出現爬升情形，且於攻毒時兩組鴨隻均無法耐過。推測可能為噴霧活毒菌苗後本來應該產生的黏膜抗體，因污染場鴨隻呼吸道存在的RA菌以及體內已存在的移行抗體所干擾，所以效力試驗眼窩下竇攻毒時對鴨隻缺乏足夠保護而發病死亡。

單獨使用不活化菌苗免疫對鴨（鵝）的保護效果已有一定的成效[4,17,19]，本病活毒菌苗的使用以及活菌搭配不活化菌苗的免疫模式則瞭解有限。本研

究依美方對污染場免疫方式的建議，以活毒菌苗噴霧後皮下注射補強不活化菌苗，與另1組僅注射不活化菌苗，並比較兩種免疫模式之差異。結果顯示攻毒第1和第2型同型菌後，兩種方式對鴨隻皆具滿意保護效果，但彼此間並無顯著差異，而且兩組同樣對第5型菌的攻毒皆不具保護力，顯示於使用活毒菌苗情形下，有無使用活毒菌苗對污染場鴨隻的保護效力意義不大。兩種免疫組鴨隻血清ELISA抗體爬升情形至8週齡無明顯差異，且攻毒後對鴨隻的保護效力亦無明顯差異。

單用活毒菌苗噴霧免疫SPF番鴨後，對同血清型菌的攻毒具保護效力，但對不同型RA菌是否具交叉保護性尚不明瞭。本研究將包含第1、2和5型活毒菌苗噴霧給予1日齡SPF番鴨後攻毒台灣常分離的第6、9與17型RA菌，結果發現活毒菌苗對第6和17型不具任何保護作用，但對第9型具有微弱交叉保護性，此結果應與文獻報告第5型與第2和9型具微弱交叉反應有關[18]。雖然國內曾有幾篇報告調查台灣水禽場於2005~2010年間流行的血清型為第1、2、3、5、6、8~12、17與21型[12,13]，但本所現有上述血清型菌株分別對4週齡來自污染場北京鴨測試毒力(LD₅₀)後，結果顯示這些菌株中除了第1、2、9和17型為強毒菌株外，第5、6和21型為中等毒力株，另外第3、8和10~12型則是弱毒菌株。前提的調查報告中分離出的RA菌來源不一，有些來自場內鴨（鵝）咽喉頭或泄殖腔拭子採樣，有些則取自健康或生病動物的剖檢臟器，因此在現場分離率高的血清型並不一定表示致病性強。考量上述因素後，本次活毒菌苗的交叉保護測試選用除第1、2和5型外的第6、9和17型進行測試。

在田間水禽場測試方面，位於三星鄉水禽場鴨隻雖飼養於新建鴨舍，該場鴨隻來源為RA污染種禽場，鴨隻具高力價移行抗體，且咽喉頭拭子可分離到RA菌，因此該場為污染場。美方活毒菌苗仿單內指示該活毒菌苗使用於1日齡鴨隻，恐與污染場鴨隻體內原有移行抗體中和，致活毒菌苗無法發揮免疫作用，如同之前污染場鴨隻在實驗室內僅噴霧免疫活毒菌苗1次缺乏保護力的結果，因此於1週齡時補強噴霧免疫

活毒菌苗1次，同樣於4週齡帶回攻毒，結果顯示單用活毒菌苗對3種血清型不具任何保護效力，污染場鴨隻補強噴霧免疫後對鴨隻的免疫作用非我們所預期的，也就是第1次噴霧免疫與移行抗體中和後，而第2次噴霧免疫就會發揮免疫效果，如同美方所言，活毒菌苗僅適用於清淨場。

另於斗六市北京鴨場使用活毒菌苗噴霧免疫2次加上注射不活化菌苗1次後帶回所內攻毒，攻毒第1型菌後兩組鴨隻無法引起過半死亡，最後導致無法評估菌苗對第1型的效力，但事後與場主討論回溯之前飼養情況後得知，鄰近鴨場曾感染過本病，當時病例曾委託中興大學檢測，結果為本病第1型感染，以本試驗場開放養殖方式推論，很有可能該場早已淪為第1型菌污染場，鴨隻長期處於少量活菌刺激免疫狀況，導致出現本試驗攻毒後所有鴨隻不死亡，且皆具高力價血清抗體的情形。另田間鴨隻攻毒第5型後與之前實驗室內測試結果一致，活毒與不活化菌苗同樣對第5型保護不良。活毒搭配不活化菌苗於四湖鄉白羅曼鵝場測試，結果鵝隻免疫後對第1和2型菌攻毒具保護效力，但對第5型則同上述仍然缺乏保護。

無論活毒搭配不活化菌苗、或是單用不活化菌苗免疫鴨隻，經實驗室與水禽場測試，對第5型菌的攻毒均不具保護力，我方與美方的第5型菌株抗原性是否相同，或者可能與第15血清型試驗結果相似，也就是Huang等人2002年文獻報告提出[16]，同一血清型但不同菌株間竟會缺乏交叉保護性，此需待更進一步測試以資證實。

有關兩間水禽場田間測試鴨隻體重秤量的結果，至8周齡時三星場北京鴨平均體重與斗六場鴨隻相差1公斤多，三星的北京鴨為櫻桃谷品系，而斗六則為一般北京鴨，櫻桃鴨為改良種，有著體脂肪分布更均勻使口感更佳等優點，但兩場的免疫組與對照組鴨隻體重並無明顯差異，所以應該是鴨種的不同導致增重也有所差異。

國內種禽場已普遍污染本病且具抗體，因此本病菌苗推薦於幼禽而非種禽，使其耐過移行抗體低落期2週齡至8週齡間易感受齡。由國外文獻報告與本所不活化菌苗研發經驗，單用不活化菌苗的短期免疫效果對國內雛鴨（鵝）之保護已足夠。一般情況下，考量活毒搭配不活化菌苗較單用不活化菌苗可引起體內抗體力價維持更久的優點，或單靠不活化菌苗其免疫效力不足等的因素，才會考慮活毒菌苗的使用。而單用活毒菌苗對他種血清型既不具交叉保護效果，且活毒搭配不活化菌苗、與單用不活化菌苗對鴨隻保護效果並無明顯差異。考量上述幾項因素，進口或自行研發活毒菌苗似乎對我國現場防疫幫助不大，未來無開發本土性活毒菌苗之必要。

誌謝

本研究承蒙本會動植物防疫檢疫局提供計畫經費補助，中華民國養鴨協會、中華民國養鵝協會、以及位於宜蘭縣和雲林縣3間水禽場的協助，多項試驗得能順利完成，謹併誌萬分謝忱。

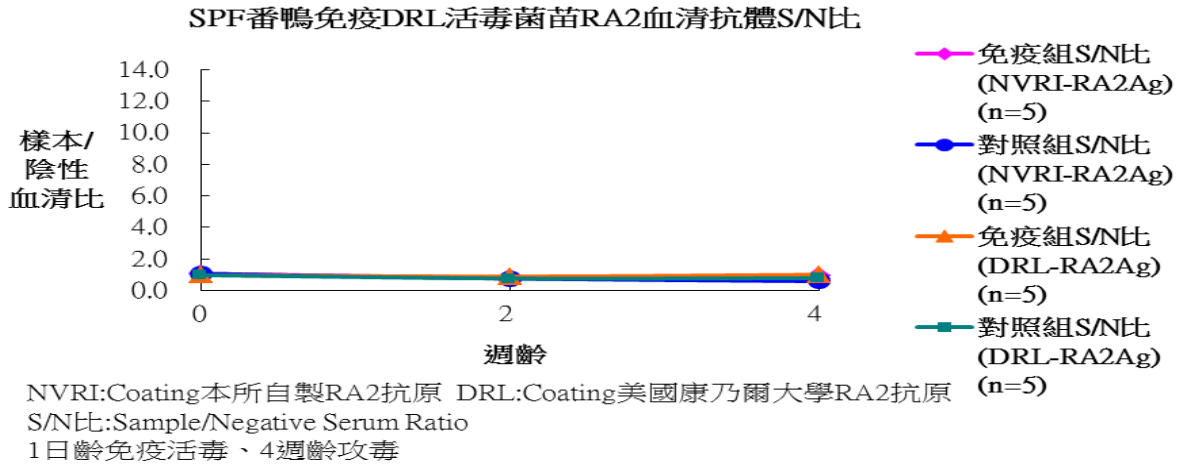


圖 1、SPF 番鴨免疫活毒菌苗血清 ELISA 抗體 S/N 比

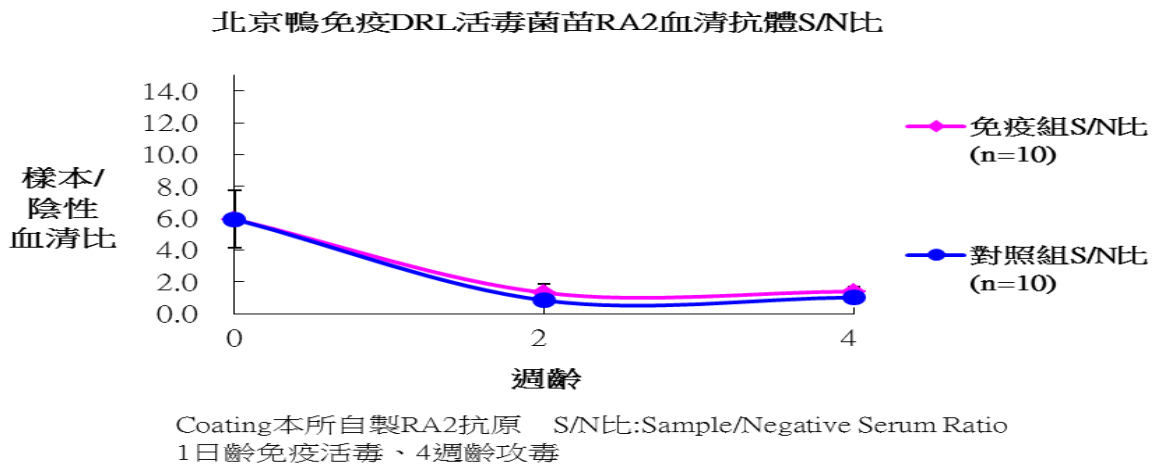


圖 2、污染場北京鴨免疫活毒菌苗血清 ELISA 抗體 S/N 比

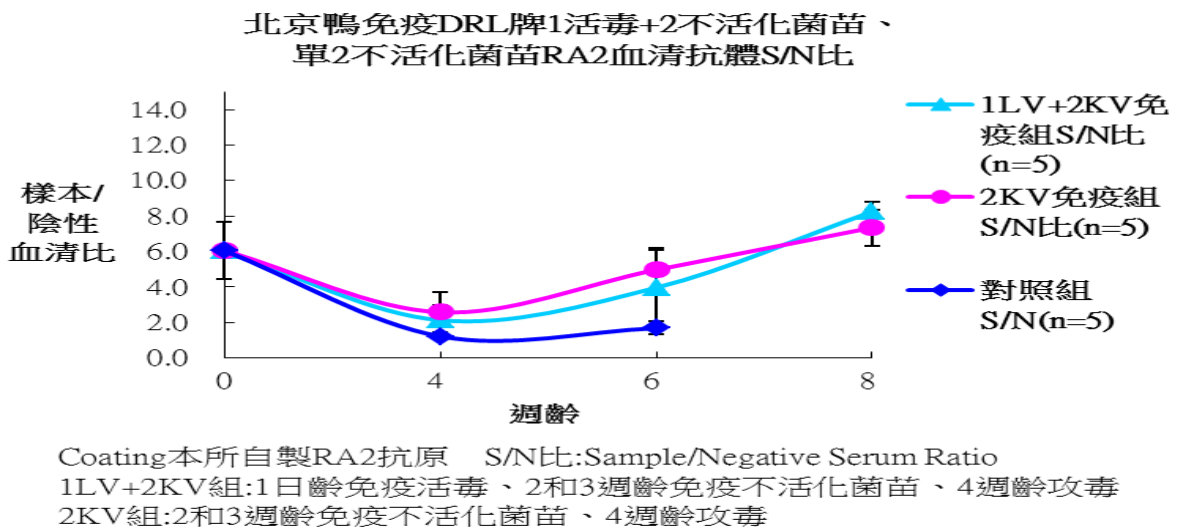


圖 3、污染場北京鴨免疫活毒搭配不活化菌苗、與單用不活化菌苗兩種模式血清 ELISA 抗體 S/N 比

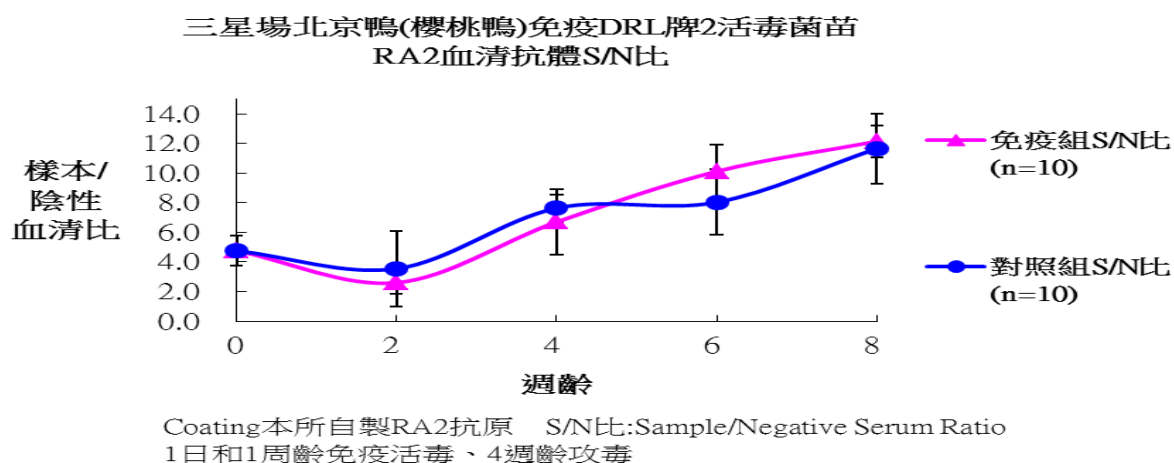


圖 4、田間水禽場三星鄉新建鴨舍北京鴨免疫活毒菌苗血清 ELISA 抗體 S/N 比

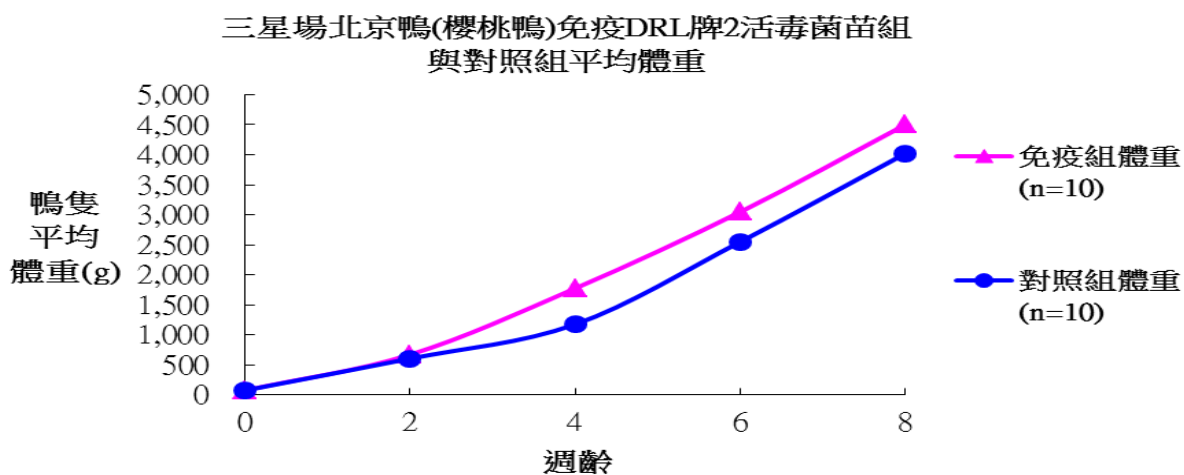


圖 5、田間水禽場三星鄉新建鴨舍北京鴨免疫組與對照組平均體重

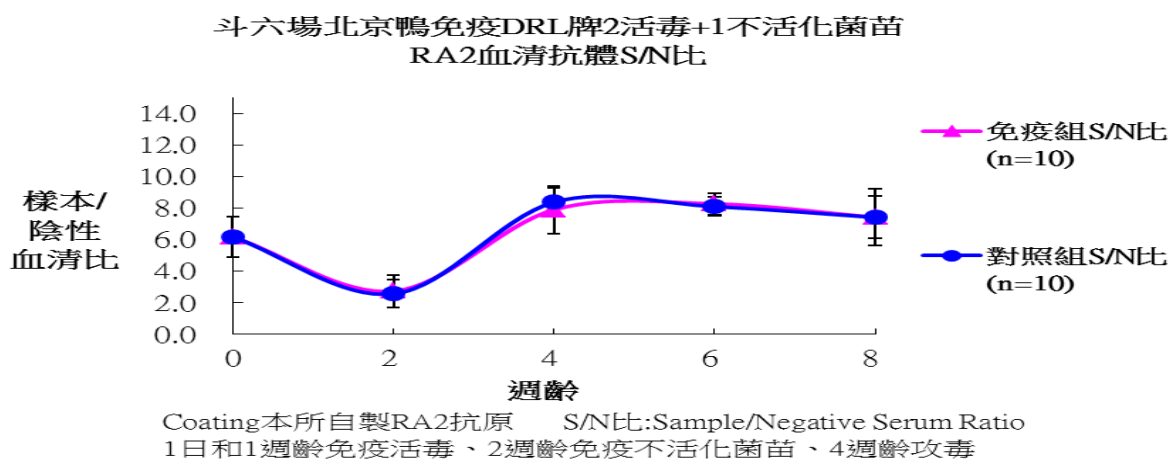


圖 6、田間水禽場斗六市北京鴨免疫活毒搭配不活化菌苗血清 ELISA 抗體 S/N 比

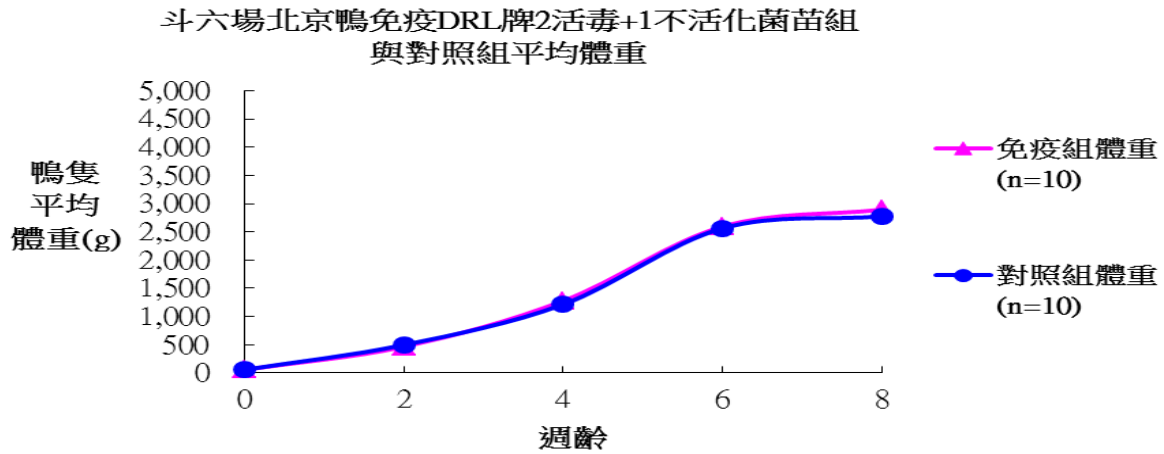


圖 7、田間水禽場斗六市北京鴨免疫組與對照組平均體重

表 1、SPF 番鴨免疫活毒菌苗效力試驗結果 (1LV)

攻毒組別	動物數	2種血清型3階段濃度菌液攻毒後			LD ₅₀	LD ₅₀ 防禦指數
		動物存活率(存活數/攻毒數)(%)				
攻毒第1血清型		10 ¹²	10 ⁹	10 ⁶		
免疫組	14	80(4/5)	80(4/5)	100(4/4)	10 ^{12.25}	
對照組	13	60(3/5)	75(3/4)	75(3/4)	10 ^{11.34}	10 ^{0.91}
攻毒第2血清型		10 ¹¹	10 ¹⁰	10 ⁹		
免疫組	14	75(3/4)	80(4/5)	100(5/5)	10 ^{11.17}	
對照組	12	0(0/4)	0(0/4)	100(4/4)	10 ^{9.50}	10 ^{1.67}

*所內自行孵化SPF番鴨1日齡時噴霧免疫活毒菌苗，4週齡時分別以第1和2同型菌株分3階段濃度菌液眼窩下竇注射攻毒。

*LD₅₀防禦指數 = 免疫組LD₅₀/對照組LD₅₀

表 2、污染場北京鴨免疫活毒菌苗效力試驗結果 (1LV)

攻毒 組別	動物數	3種血清型 4階段濃度菌液攻毒後				LD ₅₀	LD ₅₀ 防禦指數
		動物存活率(存活數/攻毒數)(%)					
		¹² 10	¹⁰ 10	⁸ 10	⁶ 10		
<u>攻毒第1血清型</u>							
免疫組	13	33(1/3)	67(2/3)	33(1/3)	75(3/4)	10 ^{7.03}	
對照組	13	67(2/3)	33(1/3)	33(1/3)	50(2/4)	10 ^{8.0}	10 ^{-0.97}
<u>攻毒第2血清型</u>							
免疫組	13	0(0/3)	0(0/3)	67(2/3)	100(4/4)	10 ^{8.50}	
對照組	13	33(1/3)	33(1/3)	67(2/3)	75(3/4)	10 ^{9.0}	10 ^{-0.5}
<u>攻毒第5血清型</u>							
免疫組	13	0(0/4)	67(2/3)	100(3/3)	100(3/3)	10 ^{9.50}	
對照組	13	75(3/4)	33(1/3)	100(3/3)	67(2/3)	10 ^{10.0}	10 ^{-0.5}

*宜蘭五結鄉購入北京鴨1日齡時噴霧免疫活毒菌苗，4週齡時分別以第1、2與5同型菌株分4階段濃度菌液眼窩下竇注射攻毒。

*LD₅₀防禦指數 = 免疫組LD₅₀/對照組LD₅₀

表 3、污染場北京鴨免疫活毒搭配不活化菌苗、與單用不活化菌苗效力比較試驗結果 (1LV+2KV、2KV)

免疫/ 攻毒組別	動物數	3種血清型 2~3階段濃度菌液攻毒後 動物存活率(存活數/攻毒數)(%)			LD ₅₀	LD ₅₀ 防禦指數
免疫活毒+不活化菌苗組						
<u>攻毒第 1 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		60(3/5)	100(5/5)	100(5/5)	$10^{11.17}$	$10^{4.54}$
<u>攻毒第 2 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		100(5/5)	100(5/5)	100(5/5)	$10^{11.50}$	$10^{3.50}$
<u>攻毒第 5 血清型</u>		10^{12}	10^{10}			
10		20(1/5)	60(3/5)		$10^{10.64}$	$10^{-0.11}$
免疫不活化菌苗組						
<u>攻毒第 1 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		100(5/5)	100(5/5)	60(3/5)	$10^{11.30}$	$10^{4.67}$
<u>攻毒第 2 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		60(3/5)	100(5/5)	100(5/5)	$10^{11.17}$	$10^{3.17}$
<u>攻毒第 5 血清型</u>		10^{12}	10^{10}			
10		20(1/5)	60(3/5)		$10^{10.64}$	$10^{-0.11}$
對照組						
<u>攻毒第 1 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		0(0/5)	0(0/5)	20(1/5)	$10^{6.63}$	
<u>攻毒第 2 血清型</u>		10^{11}	10^9	10^7		
15		0(5/5)	0(5/5)	100(5/5)	$10^{8.0}$	
<u>攻毒第 5 血清型</u>		10^{12}	10^{10}			
9		0(0/5)	75(3/4)		$10^{10.75}$	

*由宜蘭五結鄉購入1日齡北京鴨所內飼養，活毒搭不活化菌苗組於1日齡時噴霧活毒菌苗，2、3週齡時注射不活化菌苗，不活化菌苗組則於2、3週齡時注射不活化菌苗，兩種免疫組連同對照組屆4週齡時分別以第1、2、5同型菌株分2~3階段濃度菌液肌肉注射攻毒。

*LD₅₀防禦指數 = 免疫組LD₅₀/對照組LD₅₀

表 4、田間水禽場三星鄉北京鴨免疫活毒菌苗效力試驗結果 (2LV)

攻毒組別	動物數	3種血清型 2~3 階段濃度菌液攻毒後 動物存活率(存活數/攻毒數)(%)			LD ₅₀	LD ₅₀ 防禦指數
<u>攻毒第 1 血清型</u>		¹² 10	¹⁰ 10	⁸ 10		
免疫組	15	0(0/5)	20(1/5)	60(3/5)	10 ^{8.64}	
對照組	15	0(0/5)	20(1/5)	80(4/5)	10 ^{9.0}	-0.36
<u>攻毒第 2 血清型</u>		¹² 10	¹⁰ 10	⁸ 10		
免疫組	15	0(0/5)	0(0/5)	40(2/5)	10 ^{7.83}	
對照組	15	0(0/5)	0(0/5)	60(3/5)	10 ^{8.33}	-0.50
<u>攻毒第 5 血清型</u>		¹² 10	¹⁰ 10			
免疫組	10	20(1/5)	60(3/5)	10 ^{10.64}		
對照組	10	0(0/5)	80(4/5)	10 ^{10.75}	-0.11	

*宜蘭三星鄉新建鴨舍北京鴨 1 日齡與 1 週齡時噴霧免疫約 500 隻，另 2,000 隻為對照組，4 週齡時兩組各帶 45 隻回本所，分別以第 1、2 與 5 同型菌株分 2~3 階段濃度菌液眼窩下竇注射攻毒。

*LD₅₀防禦指數 = 免疫組LD₅₀/對照組LD₅₀

表 5、田間水禽場斗六市北京鴨免疫活毒搭配不活化菌苗效力試驗結果 (2LV+1KV)

攻毒組別	動物數	3種血清型 2~3 階段濃度菌液攻毒後 動物存活率(存活數/攻毒數)(%)			LD ₅₀	LD ₅₀ 防禦指數
<u>攻毒第 1 血清型</u>		¹¹ 10	⁹ 10	⁷ 10		
免疫組	13	80(4/5)	100(4/4)	75(3/4)	10 ^{>11.0}	
對照組	15	60(3/5)	100(5/5)	80(4/5)	10 ^{>11.0}	無法評估
<u>攻毒第 2 血清型</u>		¹¹ 10	⁹ 10	⁷ 10		
免疫組	13	60(3/5)	100(4/4)	100(4/4)	10 ^{11.17}	
對照組	15	20(1/5)	20(1/5)	40(2/5)	10 ^{7.41}	3.76
<u>攻毒第 5 血清型</u>		¹² 10	¹⁰ 10			
免疫組	10	0(0/5)	80(4/5)	10 ^{10.67}		
對照組	10	0(0/5)	60(3/5)	10 ^{10.33}	0.34	

*雲林斗六市北京鴨場鴨隻 1 日齡與 1 週齡時噴霧免疫約 6,000 隻，2 週齡時注射不活化菌苗，另 1,000 隻為對照組，4 週齡時兩組各帶 45 隻回本所，分別以第 1、2 與 5 同型菌株分 2~3 階段濃度菌液肌肉注射攻毒。

*LD₅₀防禦指數 = 免疫組LD₅₀/對照組LD₅₀

參考文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。動物用藥品檢驗標準 (II)。2009。
2. 吳芳、周紅、蔡建平、陸承平、范紅結。1株無致病力的鴨疫里氏桿菌的分離與鑑定。畜牧與獸醫39 (9): 13-15, 2007。
3. 洪柏懿。 *Riemerella anatipestifer* 之生物學特性。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。1995。
4. 程安春、汪銘書、郭宇飛、方鵬飛、劉兆宇、陳孝躍、周毅。鴨疫里氏菌鋁膠佐劑與鋁膠複合佐劑4價滅活疫苗的比較。中國獸醫學報25 (2): 152-157, 2005。
5. 張大丙、郭玉璞。鴨疫里氏桿菌2型與17型之間交叉反應的研究。中國預防獸醫學報24 (3): 192-194, 2002。
6. 張大丙、郭玉璞。鴨疫里氏桿菌6型、12型與16型之間的交叉反應。中國獸醫學報22 (6): 565-566, 2002。
7. 黃培峻。 *Riemerella anatipestifer* 菌苗之研製。碩士論文，國立中興大學獸醫學研究所。2004。
8. 黃國安。鴨疫里氏桿菌 (*Riemerella anatipestifer*) 毒力相關蛋白基因vapD1之次單位疫苗及DNA疫苗建構及對鴨隻免疫保護效果。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
9. 喻昭芳、黃金城。水禽雷氏桿菌症不活化多價菌苗之研發與應用。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告43: 43-51, 2008。
10. 喻昭芳、黃金城。水禽雷氏桿菌症3價不活化菌苗之效力試驗。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告44: 63-71, 2009。
11. 劉育宗。鴨 *Riemerella anatipestifer* 感染症之研究：保菌及排菌研究、聚合酶鏈鎖反應診斷技術之建立及外膜蛋白A基因序列分析。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
12. 陳燕萍、李淑慧。台灣水禽雷氏桿菌血清型別之調查。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告43: 35-41, 2008。
13. 陳燕萍、喻昭芳。傾聽人民心聲-水禽雷氏桿菌症 (RA) 防疫宣導座談會講義。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。2010。
14. Crasta K.C., Chua K.L., Subramaniam S., Frey J., Loh H., Tan H.M. Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. Journal of Bacteriology 184: 1932-1939, 2002.
15. Hatfield R.M., Morris B.A. and Henry R.R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of humoral antibody to *Pasteurella anatipestifer*. Avian Pathology 16: 123-140, 1987.
16. Huang B., Subramaniam S., Frey J., Loh H., Tan H.M., Fernandez C.J., Kwang J. and Chua K.L. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P45N') of *Riemerella anatipestifer*. Veterinary Microbiology 84: 219-230, 2002.
17. Layton H.W. and Sandhu T.S. Protection of ducklings with a broth-grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Diseases 28: 718-726, 1984.
18. Loh H., Teo T.P., Tan H.C. Serotype of *Pasteurella anatipestifer* isolate from ducks in Singapore: a proposal of new serotype. Avian Pathology 21: 453-459, 1992.
19. Pathanasophon P., Sawada T., Pramoolsinsap T., Tanticharoenyos T. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free filtrate in ducks. Avian Pathology 25: 705-719, 1996.
20. Pathanasophon P., Phuektes P., Tanticharoenyos T., Narongsak W. and Sawada T. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Pathology 31: 267-270, 2002.
21. Sandhu T.S. Immunization of white Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. Avian Diseases 23: 662-669, 1979.
22. Sandhu T.S. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatipestifer* vaccine in white Pekin ducklings: Laboratory and field trials. Avian Pathology 20: 423-432, 1991.
23. Subramaniam S., Huang B., Loh H., Kwang J., Tan H.M., Chua K.L., Frey J. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*. Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology 7: 168-174, 2000.

Safety and Potency Test on the US Commercial Live Vaccine and Inactivated Bacterin against *Riemerella anatipestifer* Infection

CF Yu*, TS Huang, CC Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The purpose of the study is to evaluate the safety and efficiency of the commercial trivalent live vaccine and inactivated bacterin (serotype 1, 2, and 5) against *Riemerella anatipestifer* infection, imported from the Duck Research Laboratory, Cornell University. After aerosol vaccination, all ducklings and goslings vaccinated with the recommended dose showed no side effect or gross pathology lesions, except one duck receiving a 10X dosage of vaccine. The Behrens-Karber method was used to determine the protection index based on LD₅₀ from vaccinated and control animals. The vaccine induced sufficient protection against homologous serotype 1 and 2 challenges in RA-free duckling farms, yet it worked poorly in those farms with animals harboring maternal antibodies. The potency test revealed satisfactory protection with no significant differences between those received live vaccine plus subsequent inactivated bacterin booster and two successive injections of inactivated bacterin of serotype 1 and 2, respectively. With aerosol vaccination of SPF Taiwan ducks using live vaccine, it was found that slight cross protection against serotype 9 was induced, but not with the serotypes 6 and 17. Aerosol administration of live vaccine with an inactivated bacterin booster was found to be efficacious against serotype 2 in ducklings and serotypes 1 and 2 in geese, but vaccination as mentioned above provided no protection in geese and ducklings against serotype 5 infection. In infected farms, we found no protection against serotype 1, 2 and 5 challenges to animals vaccinated once or twice with live vaccine.

Keywords: *Riemerella anatipestifer* infection, Avirulent live vaccine, Inactivated bacterin, Safety test, Field trial, Cross protection