

以雞蛋與鴨蛋生產抗水禽雷氏桿菌症卵黃抗體之研究與效力試驗

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 *Riemerella anatipestifer* (RA) 在水禽感染的菌苗研究已獲得一些成果，但在其被動免疫學的研究則鮮見報導。視水禽場所流行 RA 血清型別特別給予該型之卵黃抗體，使雛鴨（鵝）達成被動保護耐過易罹病之週齡，獲得緊急之預防與治療，提供水禽產業防治本病另一項選擇。本研究首先使用第 2 血清型 RA 菌苗高度免疫中齡蛋雞與蛋鴨，收集其所產之卵黃以水抽取水溶性部分（water soluble fraction；WSF），再以 Western blot 確認 WSF 所含抗體之種類，同時以酵素免疫吸附分析法（ELISA）與試管凝集試驗（TA）測定其抗體力價。在動物效力試驗方面，污染場北京鴨分兩組各給予雞 WSF（CWSF）與鴨 WSF（DWSF）後以 RA 第 2 型菌攻擊，結果免疫鴨隻均可耐過攻毒而存活；而乾淨場番鴨接種 CWSF 後攻毒，對鴨隻亦具保護效力。另外對不同效價 CWSF 與 DWSF（以 ELISA 之 S/N 比分別為 4.03 和 8.86）進行測試，結果顯示注射 0.1mL（含）以上 CWSF 或 0.01mL（含）以上 DWSF，即可對北京鴨形成保護。RA 卵黃抗體可研發成商品化之製劑，頗具臨床對抗相同血清型 RA 感染之保護力。

關鍵字：水禽雷氏桿菌症、卵黃抗體水粗萃液、水稀釋法、效力試驗

緒言

由 *Riemerella anatipestifer* (RA) 所引起的水禽雷氏桿菌症為台灣重要的水禽傳染性疾病，鴨（鵝）在 1~8 週齡對 RA 之感受性最高，主要引起病禽敗血症、全身性漿膜炎、禽隻之生長遲緩及不合格屠體之增加。各種不當的飼養環境及其他疾病之併發皆會促成本病的爆發。本病之發病率約在 5%~75%，發病之禽場常見本病一再爆發，很不容易將之完全清除，因此常造成水禽業者頗大的經濟損失[6,11]。本菌之血清型別繁多，目前已被報導的有 21 種血清型[18]，其中除了第 5 與第 2、9 型間尚具微弱的交叉抗體反應外，其他各血清型間皆無交叉保護力，因而造成其預防上的困難[11]。調查台灣各地區水禽場所流行之 RA 血清型別後，再行施打流行率上較高之 RA 血清型的多價

死毒菌苗防疫，供養禽場進行自衛防疫措施與降低其他疾病併發感染，應該是對本病之最佳的防治對策。

本病在主動的免疫學研究方面，已有世界各地學者之研製和開發各種菌苗，並獲得了一些具體保護效果[10,16,19]，但在人工被動免疫學的研究方面則較為少見。對於禽類給予特定抗原高度免疫刺激後，誘發產生特異性抗體積存於其卵黃中，並經抽取與純化，再視不同區域水禽場所流行的特殊血清型而給予卵黃抗體進行其被動保護易罹本病週齡，如此不但可讓動物在極短期內獲有保護力，達到緊急之預防與治療效果，在防衛時程上顯然比施打死菌疫苗之至少需等待 2 週以上才可獲得良好保護力之辦法為優，如此在田間水禽場之 RA 防治上亦應是一種良好有效的防疫選擇。

此外，以卵黃作為特異性抗體之生產成本頗為低

廉，又無需進行動物之大量採血或犧牲，且禽卵之卵黃中僅存有一種抗體（IgY），其分離手續頗為簡單，又可有高量之採收成果，不似哺乳動物血清中含有多種抗體，且各種抗體不易予以分離[12]。

本計畫首先選擇在台灣較高流行率的第2血清型RA菌苗高度免疫中幼齡之SPF蛋雞與蛋鴨後，並定期使用酵素聯結免疫吸附分析法（ELISA）與試管凝集法（TA）監控雞隻和鴨隻血清抗體消長情形，同時收集其全部蛋黃液以水稀釋兼抽取法獲取其含卵黃抗體之水溶性部分（water soluble fraction；WSF），以電泳分離WSF之各項成分，再以市售二級抗體確認其卵黃抗體之有無。接著進行在動物（*in vivo*）的保護試驗，即在污染場之北京鴨分別給予雞卵黃抗體水粗萃液（CWSF）與鴨卵黃抗體水粗萃液（DWSF），乾淨場之番鴨亦給予CWSF，其後以第2型菌RA攻擊之，供為計算其對RA的LD₅₀防禦指數後評估其防禦效力。另外使用不同效價CWSF與DWSF在北京鴨進行其免疫保護力測試，找出兩種WSF對鴨隻提供保護效力的最低有效劑量和效價。

當獲有前項之研發經驗，後續將使用蛋雞或蛋鴨系統生產第1型RA等流行血清型，及開發其他血清型之RA卵黃抗體，並進一步申請新藥製造許可，獲取許可證後技術移轉給疫苗廠供為量產生產主要參考依據，以為因應養禽市場之防疫需求，減少水禽產業因本病所造成的損失。

材料與方法

以 RA 第 2 血清型菌苗高度免疫蛋雞與蛋鴨

以第2血清型RA不活化菌苗添加油性佐劑（佛氏佐劑或Seppic 油性佐劑）或水性佐劑（Sigma氫氧化鋁膠佐劑）間隔2週到2個月之多次（蛋雞88週共免疫10次；蛋鴨44周共免疫5次）肌肉注射高度免疫SPF雞隻與蛋鴨（改鴨），並每月持續進行採血檢測監控其血清中第2型RA之ELISA與TA抗體力價。

以水稀釋法與離心和過濾製備含卵黃抗體之WSF水粗萃液

未來供商品化販售大量生產卵黃抗體WSF時就必需盡可能將其成本壓至最低，為此本實驗採用水稀

釋法進行某抗體之抽取，其步驟為將持續收集經RA高度免疫母雞（鴨）的產蛋以75%酒精清洗兼作外殼之消毒，再以蛋黃分離器分離卵黃與卵白，收集卵黃液加入無菌水均勻攪拌後初步過濾，加入鹽酸水溶液酸化分離脂肪層，靜置抗體液一夜後以10,000 rpm離心30分收取上清液，將上清液再予過濾，此即成為卵黃抗體WSF水粗萃液[5,13,14,15]。之後以blood agar plate、tryptic soy agar與Sabouraud agar進行無菌檢測，確定無雜菌污染，最後加入0.2%福馬林置於4°C冰箱攪拌均勻後保存。

使用 ELISA 法檢測雞（鴨）血清與卵黃 WSF 之 RA 抗體力價

持續監控檢測高度免疫後雞（鴨）隻血清與卵黃WSF水粗萃液之RA抗體力價，另外以市售雞血清與本所自行孵化SPF鴨之血清作為陰性對照血清，而蛋雞與蛋鴨在免疫前所蒐集製成卵黃WSF水粗萃液則供作WSF檢測陰性對照之樣本。所有血清與WSF水粗萃液樣本皆進行ELISA（方法詳見本所43期研究報告）檢測第2血清型血清抗體OD值與卵黃抗體OD值，之後使用Excel軟體繪製雞隻與鴨隻血清與卵黃在免疫後不同時間RA之ELISA抗體力價曲線圖。

使用試管凝集法檢測雞（鴨）血清與卵黃 WSF 水粗萃液之 RA 抗體力價

上述所有免疫組、對照組血清與WSF水粗萃液樣本，於96孔U型盤加入2倍連續稀釋樣本與新鮮培養第2型RA菌液，置於37°C輕震感作一晚，隔天觀察凝集結果[8]，最後同樣使用Excel軟體繪出血清與水粗萃液凝集抗體力價曲線圖。

以 Western Blot 法分析與確認雞源和鴨源卵黃抗體

將前述兩種WSF水粗萃液以12.5% SDS-PAGE膠片電泳分析，再以濕式轉漬器將膠片上之蛋白質轉漬至nitrocellulose membrane上，之後經washing與blocking等步驟，再以稀釋的市售標示horseradish peroxidase（HRP）山羊抗雞IgG抗體與標示alkaline phosphatase（AP）山羊抗鴨IgG抗體感作後washing，最後分別以TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）受質與BCIP/NBT（5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue

tetrazolium) 受質進行呈色，確認雞與鴨WSF水粗萃液中卵黃抗體。

雞(鴨)卵黃WSF對北京鴨與番鴨之保護效力測試

試驗用北京鴨購自畜產試驗所宜蘭分所(污染場)，番鴨為本所自行孵化(清淨場)，鴨隻於2週齡時被動免疫試驗前採血檢測ELISA抗體。供進行後續免疫保護力試驗之鴨隻，必須待其體內之RA移行抗體消退後才可進行試驗。

北京鴨2週齡時分別肌肉注射接種雞源WSF與鴨源WSF，同時攻毒3階段濃度第2型RA菌液，2週觀察期間記錄死亡情形，最後計算出其LD₅₀防禦指數以評估兩種WSF被動免疫鴨隻的保護力[1,2]。SPF番鴨同樣於2週齡時給予雞源WSF後攻毒第2型RA菌，同樣使用LD₅₀防禦指數評估效力。

不同效價雞(鴨)卵黃WSF對北京鴨之保護效力測試

北京鴨2週齡時分別接種不同效價CWSF水粗萃液(0.01、0.1、0.25、0.5或1 mL)與DWSF水粗萃液(0.001、0.01或0.1 mL)，同時另各置一組未免疫組當對照，並進行攻擊3階段細菌LD₅₀力價之第2型菌液，於攻擊2週觀察後收集各組之存活和死亡鴨隻，供為計算其LD₅₀防禦指數之保護效力。

結果

使用ELISA法檢測雞(鴨)血清與卵黃WSF之RA抗體力價

免疫組雞隻持續檢測的血清與WSF水粗萃液的ELISA抗體S/N比【Sample serum (Sample WSF) / Negative serum (Negative WSF)】曲線圖如圖1，雞隻前3次高度免疫RA菌苗時使用佛氏油性佐劑，結果該佐劑造成雞隻肌肉結節，恐影響疫苗吸收效果，於是後續改用鋁膠水性佐劑，然卻未見雞隻之RA血清抗體明顯爬升，再改用Seppic油性佐劑與第2型RA抗原混合後補強免疫，但雞隻對菌苗免疫後之免疫反應仍未見明顯提升，抗體仍然無上升現象。血清ELISA抗體部分在基礎免疫後第4、20和32週出現3個S/N比為4~6的小高峰，水粗萃液ELISA抗體的S/N介於

3~4，一直呈現低力價情形。

免疫組鴨隻持續檢測的血清與WSF水粗萃液的ELISA抗體S/N比曲線圖如圖2，有了之前雞隻注射疫苗後造成局部結節的經驗，這次鴨隻前兩次免疫使用鋁膠佐劑免疫，之後改用Seppic牌油性佐劑免疫，結果發現鴨隻血清與水粗萃液的ELISA抗體都會在免疫後4~8週出現S/N比為10~13的高峰，且兩者抗體曲線起伏一致，顯示鴨隻對第2型RA菌苗的免疫刺激反應明顯。

使用試管凝集法檢測雞(鴨)血清與卵黃WSF之RA抗體力價

免疫組雞隻持續檢測的血清與WSF水粗萃液的試管凝集抗體曲線圖如圖3，血清凝集抗體力價在1~16，CWSF抗體力價為1~128，血清和CWSF中的TA抗體的起伏與有無免疫的相關性不大。

免疫組鴨隻持續檢測的血清與WSF水粗萃液的試管凝集抗體曲線圖如圖4，血清的凝集抗體力價在免疫後16、32週分別出現16和64高峰，DWSF在免疫後12~20、32週出現16和32之抗體力價，血清和DWSF兩者凝集抗體曲線起伏一致，且與ELISA抗體亦一致。

以Western Blot法分析與確認雞源和鴨源卵黃抗體

雞隻WSF的西方墨點法轉漬圖如圖5，在分子量70附近可見卵黃抗體重鏈蛋白質帶，在分子量約25 kDa可見輕鏈。鴨隻WSF的轉漬圖如圖6，62 kDa左右可見卵黃抗體重鏈，36 kDa可見缺失型卵黃抗體重鏈帶，23 kDa附近則是卵黃抗體輕鏈。

雞(鴨)卵黃WSF對北京鴨與番鴨之保護效力測試

對污染場北京鴨和乾淨場番鴨接種雞源WSF後攻毒第2型RA菌，結果兩種鴨隻可耐過攻毒存活，其LD₅₀防禦指數介於10^{1.50}~10^{2.83}，詳如表1。同樣污染場北京鴨給予鴨源WSF後攻毒RA菌後，LD₅₀防禦指數為10^{1.50}，詳如表2，同樣可提供足夠保護。

不同效價雞(鴨)卵黃WSF對北京鴨之保護效力測試

污染場北京鴨分別接種5種不同效價雞源WSF後

攻毒第2型RA菌，結果LD₅₀防禦指數介於10⁰~10^{2.83}（詳如表3）。鴨隻在給予0.1 mL（含）以上CWSF後（ELISA的S/N比=4.03，凝集抗體1:128）可耐過存活。而北京鴨給予3種不同效價鴨源WSF後攻毒，其LD₅₀防禦指數介於10^{0.50}~10^{2.50}，至少給予0.01 mL（含）以上DWSF後（ELISA的S/N比=8.86，凝集抗體1:32）對雞鴨具足夠保護效力。

討論

本計畫的進行首先選擇目前在台灣分離率高且病害性亦高的第2血清型RA菌，作為抗原高度免疫SPF雞隻，由2005年至2008年中區、嘉南與南區家禽保健中心送檢本病鴨（鵝）分離株中，第2型約佔分離中10.2%~28.6%[4]。

雞隻高度免疫RA菌苗後，其血清與卵黃抗體對免疫反應不大，但鴨隻高免RA菌苗後，其免疫刺激反應相當明顯，且血清與卵黃抗體反應一致，ELISA抗體與凝集抗體起伏亦一致。當初會先使用雞隻作為IgY生產系統的原因主要為SPF雞隻取得容易，且雞隻與鴨、鵝間共通的疾病較少，所以首先選擇此系統，但由雞隻血清與卵黃抗體力價反應可知，使用雞隻生產抗體似乎成效不佳。

雞隻與鴨隻卵黃WSF以SDS-PAGE膠片電泳後再進行蛋白質轉漬，雞隻轉漬圖中分子量約70 kDa與25 kDa處出現的條帶應分別為雞隻卵黃抗體的重鏈與輕鏈，而鴨隻轉漬圖中約62 kDa和36 kDa分別為鴨隻完整型與缺失型卵黃抗體重鏈，分子量約23 kDa則為輕鏈，以此可證實為卵黃抗體[3]，但由未免疫對照組亦可見同樣蛋白，應是卵黃中本來具有的抗他種

抗原的卵黃抗體和卵黃中其他水溶性蛋白（α、β蛋白等）所造成。

雞源與鴨源卵黃抗體水粗萃液應用在動物測試上，污染場北京鴨分別給予兩種水粗萃液後攻毒第2型RA菌，以及乾淨場番鴨接種雞源水粗萃液後同樣攻毒，結果鴨隻均可耐過攻毒存活。顯示使用被動免疫方式給予雞鴨卵黃抗體時，此抗體確實在體內可引起中和RA菌的功能，進而有效預防本病感染。

另外兩種水粗萃液使用不同效價對北京鴨測試最低劑量效力測試，結果發現至少使用0.1 mL（含）雞源WSF（ELISA的S/N比=4.03，凝集抗體1:128）與0.01 mL（含）鴨源WSF（ELISA的S/N比=8.86，凝集抗體1:32）時，即可對鴨隻形成保護效力。

在雞隻與鴨隻對RA菌苗的免疫刺激反應方面，雞隻反應小，而鴨隻反應明顯，加上雞隻與鴨隻卵黃水粗萃液對雞鴨效力試驗中，相較於雞隻WSF，鴨隻僅需雞隻的1/10劑量即可達到最低保護效力，未來將改為使用蛋鴨作為卵黃抗體生產系統。但如使用鴨隻系統生產卵黃抗體預防疾病，則有一個不可避免的缺點，可能將鴨隻蛋傳染性疾病病原藉由給予卵黃水粗萃液而一併注射進入雞鴨（鵝）體內，此潛在的威脅不容小覷。國外文獻提過可將製備好的卵黃抗體進行γ射線輻射滅菌，此法似乎可有效滅菌且可解決疾病傳播困擾。選擇使用乾淨SPF產蛋鴨外，在飼養過程與產蛋過程中，特別注重飼養環境與衛生管理，以及加強生物安全等程序，以期在源頭處事先避免與預防其他病原存在於鴨蛋內的機會。

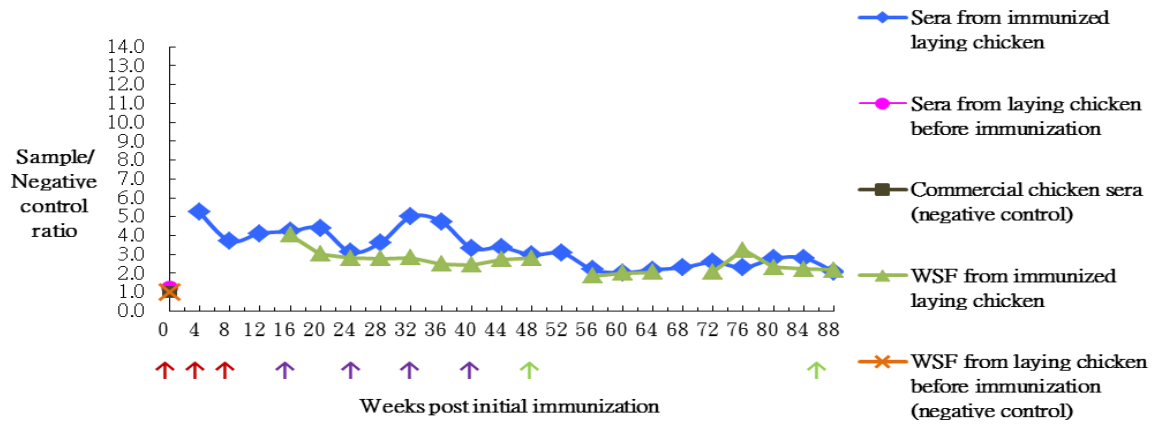


Figure 1. Sera and water soluble fraction (WSF) were obtained from laying chickens immunized with *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 2 whole cells. Testing samples in a 100-fold dilution were measured by ELISA using sonicated homologous RA cells as antigen at OD 450nm. Arrows indicate the week of immunization.

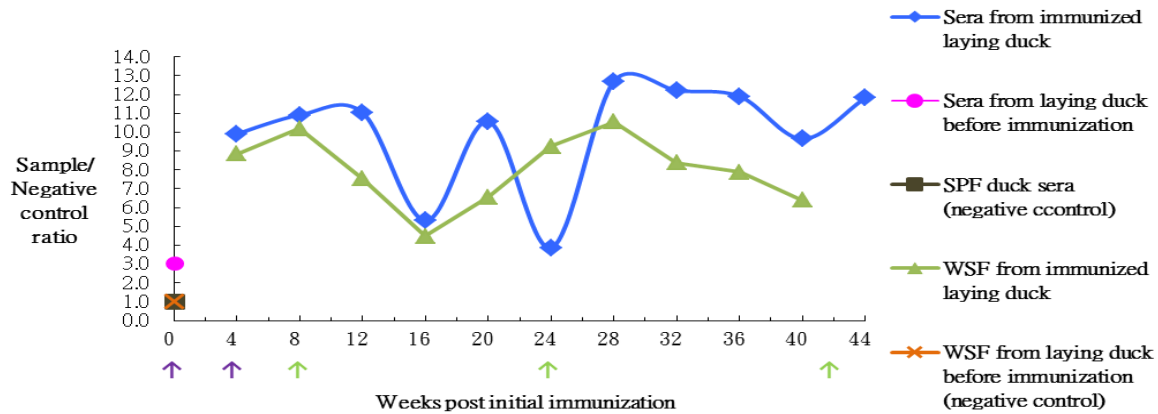


Figure 2. Sera and water soluble fraction (WSF) were obtained from laying ducks immunized with *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 2 whole cells. Sera and WSF samples in 1000-fold and 100-fold dilution respectively, were measured by ELISA using sonicated homologous RA cells as antigen at OD 450 nm. Arrows indicate the week of immunization.

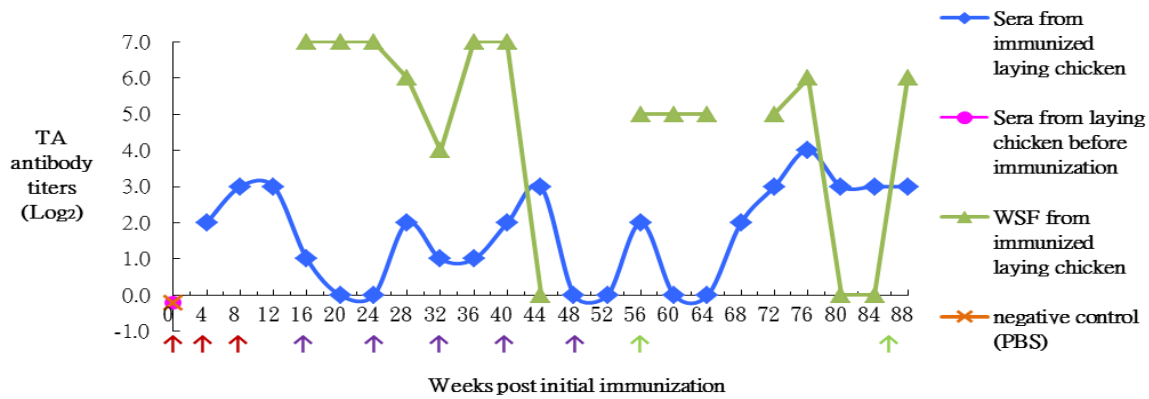


Figure 3. Sera and water soluble fraction (WSF) samples were obtained from laying chickens immunized with *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 2 whole cells and measured in 2-fold serial dilutions. Tube agglutination (TA) antibody was performed by using homologous RA living cells as antigen.

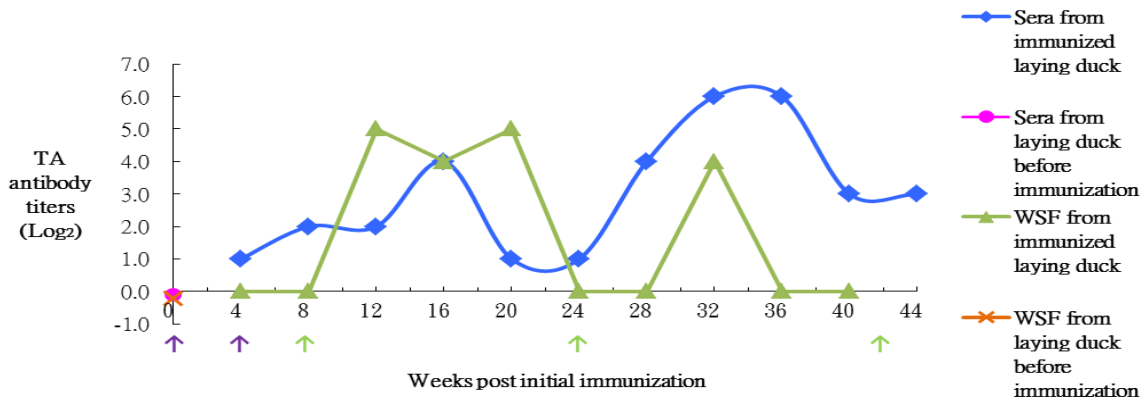


Figure 4. Sera and water soluble fraction (WSF) samples were obtained from laying duck immunized with *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 2 whole cells and measured in 2-fold serial dilutions. Tube agglutination (TA) antibody was performed by using homologous RA living cells as antigen.

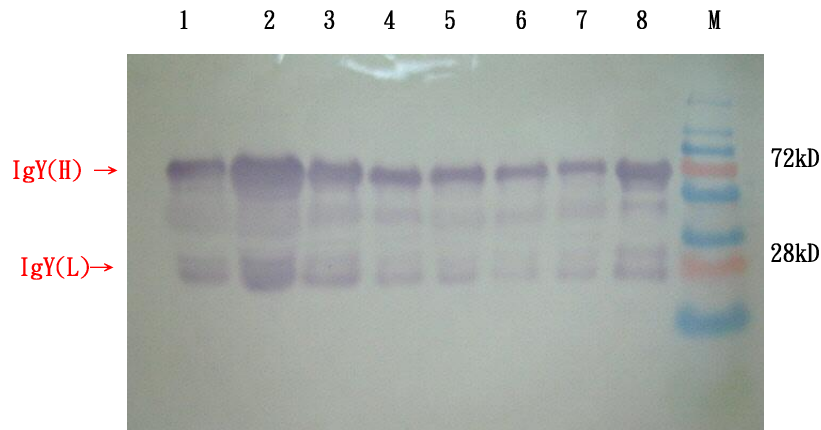


Figure 5. Transferring membrane pattern by Western blot in water soluble fraction (WSF) obtained from immunized laying chickens. Lane 1,2: 10-fold concentrated WSF from laying chicken without or with immunization of RA bacterin respectively; Lane 3-6: WSF from immunized laying chicken collected at variant weeks post immunization; Lane 7: WSF from nonimmunized laying chicken; Lane 8: Commercial chicken IgY powder; M: Protein marker.

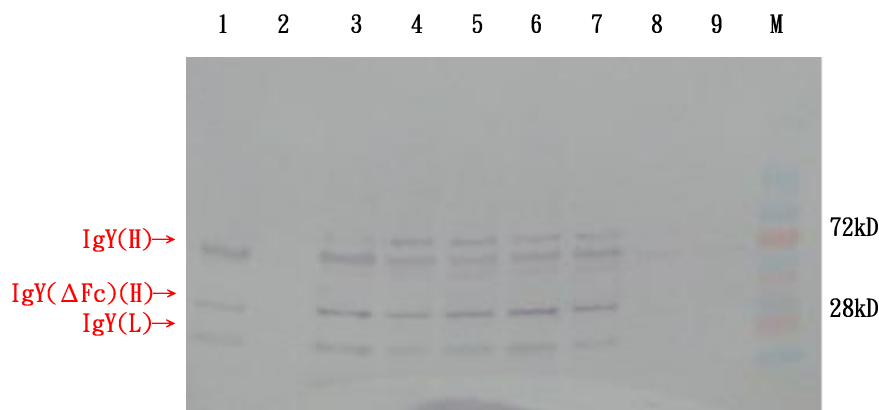


Figure 6. Transferring membrane pattern by Western blot in water soluble fraction (WSF) obtained from immunized laying duck. Lane 1: Commercial duck IgY; Lane 2: Negative control (PBS); Lane 3: IgY extracted from commercial purification kit; Lane 4-9: WSF from immunized laying duck collected at variant weeks post immunization; M: Protein marker.

Table 1

Protectivity of water soluble fraction (WSF) collected from laying chicken immunized with the serotype 2 of *Riemerella anatipestifer* (RA) bacterin, against homologous challenge in Peking ducks or Muscovy ducks.

WSF of chicken immunizing group	Challenge with variant LD ₅₀			LD ₅₀ protection index [#]
	10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁷	
Peking Ducks Immunized ^a	66.7(2/3)*	100(4/4)	100(3/3)	10 ^{1.50}
Nonimmunized	0(0/5)	100(4/4)	100(4/4)	
SPF Muscovy ducks Immunized ^b	75(3/4)	100(3/3)	100(3/3)	10 ^{2.83}
Nonimmunized	0(0/3)	33.3(1/3)	100(3/3)	

* Survival rate % (number of survival birds/total challenged birds)

LD₅₀ protection index : LD₅₀ of immunized group/LD₅₀ of nonimmunized group

^a WSF collected from laying chicken used for immunizing Peking duck was found with the S/N ratio in ELISA of 2.78 and with tube agglutination antibody titer of 1:64.

^b WSF collected from laying chicken used for immunizing Muscovy duck was found with the S/N ratio in ELISA of 3.23 and with tube agglutination antibody titer of 1:64.

Table 2

Protectivity of water soluble fraction (WSF) collected from laying duck immunized with the serotype 2 of *Riemerella anatipestifer* (RA) bacterin, against homologous challenge in Peking ducks.

WSF of duck immunizing group	Challenge with variant LD ₅₀			LD ₅₀ protection index [#]
	10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁷	
Immunized ^c	0(0/3)*	33.3(1/3)	66.7(2/3)	10 ^{1.50}
Nonimmunized	0(0/3)	0(0/3)	0(0/3)	

* Survival rate % (number of survival birds/total challenged birds)

LD₅₀ protection index : LD₅₀ of immunized group/LD₅₀ of nonimmunized group

^c WSF collected from laying duck used for immunizing Peking duck was found with the S/N ratio in ELISA of 8.86 and with tube agglutination antibody titer of 1:32.

Table 3

Protectivity of water soluble fraction (WSF) with different antibody titers collected from laying chicken immunized with the serotype 2 of *Riemerella anatipestifer* (RA) bacterin, against homologous challenge in Peking ducks.

WSF of chicken immunizing group	Challenge with variant LD ₅₀			LD ₅₀ protection index [#]
	10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁷	
Immunized ^d				
0.01 mL	0(0/3)*	0(0/3)	0(0/3)	10 ⁰
0.1 mL	0(0/3)	0(0/3)	66.7(2/3)	10 ^{1.0}
0.25 mL	0(0/3)	0(0/3)	66.7(2/3)	10 ^{1.0}
0.5 mL	0(0/3)	33.3(1/3)	100(3/3)	10 ^{2.0}
1 mL	0(0/3)	100(3/3)	33.3(1/3)	10 ^{2.83}
nonimmunized	0(0/3)	0(0/3)	0(0/3)	

* Survival rate % (number of survival birds/total challenged birds)

LD₅₀ protection index : LD₅₀ of immunized group/LD₅₀ of nonimmunized group

^d WSF collected from laying chicken used for immunizing Peking duck was found with the S/N ratio in ELISA of 4.03 and with tube agglutination antibody titer of 1:128.

Table 4

Protectivity of water soluble fraction (WSF) with different antibody titers collected from laying duck immunized with the serotype 2 of *Riemerella anatipestifer* (RA) bacterin, against homologous challenge in Peking ducks.

WSF of duck immunizing group	Challenge with variant LD ₅₀			LD ₅₀ protection index [#]
	10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁷	
Immunized ^e				
0.001 mL	0(0/3)*	0(0/3)	50(2/4)	10 ^{0.50}
0.01 mL	0(0/3)	33.3(1/3)	66.7(2/3)	10 ^{1.50}
0.1 mL	0(0/3)	66.7(2/3)	66.7(2/3)	10 ^{2.50}
Nonimmunized	0(0/3)	0(0/3)	0(0/3)	

* Survival rate % (number of survival birds/total challenged birds)

LD₅₀ protection index : LD₅₀ of immunized group/LD₅₀ of nonimmunized group

^e WSF collected from laying duck used for immunizing Peking duck was found with the S/N ratio in ELISA of 8.86 and with tube agglutination antibody titer of 1:32.

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. 成連貴、齊雷。雞抗鴨副黏病毒病高免卵黃抗體的研製。安徽農業科學 35(24):7478~7479, 2007。
3. 孫凌霜、齊岩、史楠、王君傳。鴨、鵝卵黃免疫球蛋白提取的比較研究。中國家禽 28(19):70~72, 2006。
4. 陳燕萍。台灣水禽雷氏桿菌症防治策略。行政院農業委員會家畜衛生試驗所傾聽人民心聲-水禽雷氏桿菌症(RA)防疫宣導座談會。2010。
5. 康亦兼、咸漠、李文興。水稀釋法分離卵黃IgY。吉林大學自然科學學報3:84-86, 2001。
6. 黃國安。鴨疫黎氏桿菌 (*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。
7. 黃敏、孔明航、王麗明。雞蛋清中溶菌酶的提取與抑菌作用。中國食品添加劑雜誌 3:154-157, 2010。
8. 黃旭田、徐華山、莊啟增、蔡睦宗、陳文烈、洪信雄、張榮儒。屏東縣水禽傳染性漿性漿膜炎之調查研究-關於病原分離、肉眼及組織病理學變化、血清凝集抗體分析調查。台灣畜牧獸醫學會會報57:63-70, 1991。
9. 喻昭芳、黃金城、趙馨華。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、聚合酶連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. 劉瑞珍、劉振發、張致維、黎煥耀、戴謙、陳立人。分子牧場之應用與開發-I-以母雞為生物工廠生產抗腸病毒71型IgY抗體。農業生技產業季刊-動物生技10:34-41, 2007。
13. 蘇和平、岳佩瑩、丁懷謙、黃加成。加工處理對雞蛋蛋黃抗體安定性之影響。中國畜牧學會會誌28(1):115-124, 1999。
14. Akita E.M. and Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. Journal of Food Science 57:629-634, 1992.
15. Fichtali M.B., Charter E.A., Lo K.V. and Nakai S. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. Journal of Food Science 32:52-56, 1993.
16. Layton H.W. and Sandhu T.S. Protection of ducklings with a broth-grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Diseases 28:718-726, 1984.
17. Lee E.N., Sunwood H.H., Menninen K. and Sim J.S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody(IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Poultry Science 81:632-641, 2002.
18. 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.
19. Sandhu T.S. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella antipestifer* vaccine in white Peking ducklings: laboratory and field trials. Avian Pathology 20:423-432, 1991

Development of Passive Protection Antibodies against *Riemerella anatipestifer* Infection Isolated from the Egg Yolk of Vaccinated Chicken/Duck

CF Yu, TS Huang, CC Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract In order to develop therapeutic antibodies against *Riemerella anatipestifer* (RA) infection, chicken and duck were hyper-immunized with RA serotype 2 bacterin, and their egg yolks were collected and processed to obtain chicken and duck water soluble fractions (CWSF and DWSF) using the water dilution method. The antibody titers against RA from the serum samples and WSFs were determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and tube agglutination test. The IgYs in WSFs were further confirmed by Western blot analysis. The results showed that both CWSF and DWSF could provide effective passive protection against homologous serotype RA challenge in Peking duck. CWSF also showed a protective passive protection against homologous challenge in a specific-pathogen free Muscovy duck test model.

Keywords: *Riemerella anatipestifer* infection, egg yolk antibody, water soluble fraction, water dilution method, potency test.

