

鴨病毒性肝炎及水禽小病毒多價卵黃抗體之研發

施雨華*、曾俊憲、許愛萍、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 研發抗鴨病毒性肝炎及水禽小病毒卵黃抗體，應用於雛鴨可有效控制鴨病毒性肝炎及水禽小病毒之感染。完成鴨病毒性肝炎卵黃抗體針劑之安全效力試驗及進行二場委託試驗。結果顯示鴨病毒性肝炎卵黃抗體針劑力價達 1,000 倍以上可以提供良好之保護力。水禽小病毒卵黃抗體針劑，血清抗體力價達 3,000 倍以上，可維持 10 天以上血清抗體力價達國家檢定標準。由此建議鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑需大於血清中和抗體 1,000 倍以上，而水禽小病毒卵黃抗體製劑需大於血清中和抗體 3,000 倍以上，方可使用於現場。此成果將可提供水禽產業被動免疫的需求，有效預防及治療疾病。

關鍵詞：鴨病毒性肝炎、水禽小病毒、卵黃抗體。

緒言

水禽有兩大重要病毒性疾病，分別為鴨病毒性肝炎以及水禽小病毒感染症。鴨病毒性肝炎主要發生在雛鴨，為一急性致死性疾病，以肝炎為主要病變特徵，會感染 6 週齡以下雛鴨，尤其是對 3 週齡以下的雛鴨會造成高死亡率[1,2]。本病於 1948 年首先在美國紐約長島由 Levene 及 Fabricant 報告，台灣則分別於 1972 與 1990 年發生兩次大流行。鴨肝炎病毒 (Duck hepatitis virus; DHV) 依據血清學方法可區分成 DHV-I、II、III 三型[3,4,12]。目前 DHV-II 只發生於英國，DHV-III 只於美國有發生之報告，病原同為星狀病毒科 (*Astroviridae*) [9]。以 DHV-I 分布最廣、病原性最強，為 *Picornaviridae* 中的 *Avihepatovirus* 病毒屬中之鴨肝炎 A 病毒 (Duck hepatitis A virus; DHAV) [10,11]。DHV-I 的發病率可達 90% 以上，而死亡率則依年齡不同而異，鴨隻品種不同對於 DHV 的敏感性也不同，小於 1 週齡之小鴨其死亡率可達 95%，隨著年齡愈高，發病率與死亡率則愈低，死後剖檢主要病變為肝臟出血，肝細胞的壞死[7,8]。

水禽小病毒感染症由鵝源水禽小病毒 (Goose

parvovirus; GPV) 或鴨源水禽小病毒 (Muscovy duck parvovirus; MDPV) 感染雛鵝及雛鴨，於臨床上呈現纖維素性壞死性腸炎、排出黃白色或水樣性下痢便、癒後發育不良及短嘴等。1967 年由匈牙利之 Derzsy 首先報告，台灣於 1982 年及 1989 年分別由鵝源及鴨源水禽小病毒感染鵝、鴨造成雛鵝及雛鴨大量死亡 [1,2]。GPV 對鵝及正番鴨均具高病原性，主要病徵為腸炎，感染率及死亡率甚高；MDPV 對鵝並無病原性，但是所有鴨種對 MDPV 則均具有感受性，感染鴨隻之死亡率高達 70% 以上[5]。

雖然此二種疾病皆有活毒減毒疫苗可供種禽免疫，然而施打疫苗可能造成緊迫使得種禽產蛋下降甚至停止產蛋，因而減低農戶免疫的意願。且不同種禽場的雛鵝和雛鴨移行抗體力價皆不同，造成部份幼禽仍有疫情發生；部份嚴重污染場，施打疫苗效果有限，需配合被動免疫才能獲得更好控制。本研究擬開發用於預防鴨病毒性肝炎、水禽小病毒感染症等病毒性疾病之多價卵黃抗體，以解決水禽產業被動免疫之需求，不但能提供疾病之預防，亦能提供疾病之治療控制。

材料方法

雞群及鴨群免疫：

以DHAV-1活毒弱毒株作為基礎免疫，並以適量(0.2% v/v)甲醛不活化後添加適量油質佐劑(10% v/v)製成補強用不活化疫苗供雞隻免疫。以GPV和MDPV活毒弱毒株作為基礎免疫，以甲醛不活化後添加油質佐劑製成補強用不活化疫苗供鴨隻免疫，於產蛋期前分別完成基礎免疫及補強免疫，每兩個月補強一次，以使產蛋期中之血清中和(Serum neutralization; SN)抗體皆維持於20,480倍以上。

卵黃抗體製備：

以抗DHAV-1、GPV和MDPV病毒之SN抗體力價達20,480倍以上母禽生產之卵黃，經抗體萃取、添加最終濃度0.2% (v/v)之福馬林防腐並稀釋後製成DHAV-1病毒SN抗體力價達1,000倍以上之卵黃抗體製劑，GPV和MDPV病毒SN抗體力價均達3,000倍以上之卵黃抗體製劑。以此進行安全效力試驗。

安全試驗及效力試驗：

一、「鴨病毒性肝炎卵黃抗體」安全及效力試驗：

(一)安全試驗：選1日齡健康正番鴨30隻分成3組，第一組10隻，每隻各肌肉注射本劑1劑量(0.5ml/隻)，第二組10隻，每隻各肌肉注射本劑2劑量，第三組10隻為未注射對照。於注射後觀察10天，接種鴨必須無任何不良反應而健存，且試驗組與對照組之增重也應無顯著性差異。

(二)效力試驗：選取1日齡低DHAV-1抗體之健康正番鴨20隻分成2組，每組各10隻，第1組每隻各肌肉注射本劑1劑量，第2組為未注射對照，於卵黃抗體注射後24小時，每組分別以DHAV-1強毒(1,000 LD₅₀)肌肉注射攻擊，於攻擊後連續觀察10天。結果試驗組之存活率需達80%以上，對照組之死亡率須達80%以上。

二、「水禽小病毒雙價卵黃抗體」安全及效力試驗：

(一)安全試驗：選1日齡健康正番鴨30隻分成3組，第一組10隻，每隻各肌肉注射本劑1劑量，第二組10隻，每隻各肌肉注射本劑2劑量，第三組10隻為未注射對照。於注射後觀察14天，本產品接種鴨必須無任何不良反應而健存，且試驗組與對照組之增重也無顯著性差異。

(二)效力試驗：選取1日齡低水禽小病毒抗體之健康正番鴨40隻分成2組，每組20隻，第1組每隻各肌肉注射本劑1劑量，第2組為未注射對照，於卵黃抗體注射後24小時，每組取10隻分別以GPV與MDPV強毒肌肉注射攻擊(MDPV 1,000 LD₅₀; GDV 1,000 ID₅₀)，於攻擊後連續觀察21天。結果試驗組之存活率需達80%以上，對照組之感染率須達80%以上，試驗組與對照組之體重需有顯著差異。

卵黃抗體製劑抗體力價與抗體消長試驗：

一、「鴨病毒性肝炎卵黃抗體」：

正番鴨、土番鴨及改鴨各40隻為一組。鴨隻以血清中和抗體力價200、400、800及1000倍之DHAV-1卵黃抗體製劑肌肉注射一劑量(0.5 mL/隻)，每組於被動免疫後第7日及第10日各取20隻小鴨，10隻心臟採血，將血清經56°C非熱化30分鐘後，以Hank's磷酸緩衝液行10倍稀釋，另置DHAV-1病毒液也以Hank's磷酸緩衝液進行10倍之連續稀釋。各稀釋病毒液加入等量稀釋血清或Hank's磷酸緩衝液為對照，置室溫感作60分鐘，再分別各取0.2 mL接種於鴨胚腎臟初代細胞以進行病毒中和抗體力價測定，每階段稀釋接種4孔腎臟初代細胞，接種之細胞置37°C繼續培養6日後，以甲醛固定後加入0.5%結晶紫液染色，各孔細胞若出現有細胞病變效應則視該抗體濃度未具中和能力，以此判定DHAV-1中和抗體力價(Neutralization index; NI)，NI值>3.0即具保護效力。另外10隻以肌肉接種1,000 LD₅₀之DHAV-1強毒株，經連續7日觀察後判定結果。

二、「水禽小病毒雙價卵黃抗體」：

抗體力價SN值小於10之1日齡正番鴨、北京鴨

各100隻。卵黃抗體稀釋成不同SN抗體力價，以肌肉注射0.5mL免疫每隻鴨。免疫後定期採血，每次各取3隻小鴨，心臟採血，以其血清進行血清中和試驗，探討抗體消長情形。

鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑田間委託試驗：

委託國立中興大學選定田間試驗配合場2場，鴨群為5,000-10,000隻小鴨，先取20隻1日齡小鴨行心臟採血檢測抗DHAV-1病毒中和抗體力價，該鴨群之平均移行抗體力價應為NI < 1.5。另取該20隻小鴨之肝臟製成10%乳劑，經過3,000 rpm離心，取上清液經過0.2 μ m濾膜過濾，再將濾液接種（0.2mL/胚）於5個7-8日齡無特定病原（specific pathogen free；SPF）雞胚胎尿囊腔內培養，經連續繼代3代，以確認該群小鴨未感染DHAV-1。另置200隻為無被動免疫本劑之對照組，被動免疫組小鴨在1和10日齡時，每隻分別各肌肉注射本劑0.5mL，於注射後不得有任何由本劑所引起之不良反應、體重顯著減輕或死亡。於被動免疫後第2、7和14日每組各選取10隻以DHAV-1強毒株肌肉注射（1,000LD₅₀/隻）攻擊，於攻擊後繼續飼養觀察10日，每日登記其死亡率，試驗組之存活率需達80%以上，對照組之死亡率需達80%以上。於攻擊後第10日犧牲剖檢觀察其病理病變，並比較病理病變嚴重程度。全部被動免疫組和對照組於30日齡時統計其存活率和增重應具有顯著性差異。

結果

安全效力試驗：

一、「鴨病毒性肝炎卵黃抗體」、「水禽小病毒雙價卵黃抗體」安全及效力試驗：

安全試驗以1劑量及2劑量卵黃抗體免疫正番鴨秤重並觀察10至14日，結果顯示鴨隻增重與對照組並無顯著差異且並無死亡與任何不良反應，健存之鴨隻犧牲後解剖觀察並無任何肉眼病變（表1）。

效力試驗以1劑量免疫正番鴨，24小時後攻毒，結果顯示免疫組鴨隻並無死亡與任何不良反應，健存之鴨隻犧牲後解剖觀察並無任何肉眼病變。水禽小病毒雙價卵黃抗體試驗組以GPV強毒攻毒之體重與對

照組具顯著差異（試驗組平均體重：356.1g，對照組平均體重：285.832g，p value =0.018），以MDPV攻毒組平均體重344.825g，對照組則死亡率100%。

卵黃抗體製劑抗體力價與抗體消長試驗：

一、「鴨病毒性肝炎卵黃抗體」：

土番鴨及改鴨以SN抗體力價800及1,000倍之DHAV-1卵黃抗體製劑肌肉注射一劑量後第10日其抗體NI值均高於3.0，SN抗體力價800以上之卵黃抗體試驗組鴨隻可以100%耐過強毒株攻毒。以SN抗體力價200及400倍之DHAV-1卵黃抗體製劑被動免疫1日齡雛鴨，雖然於被動免疫後7日攻毒可以100%耐過，但是部分鴨隻肝臟呈現出血及脂肪肝病變，被動免疫後10日攻毒鴨隻死亡率為10至30%（表2）。

二、「水禽小病毒雙價卵黃抗體」：

以抗體力價皆為SN 3,200倍以上水禽小病毒卵黃抗體針劑注射正番鴨100隻。注射後1小時鴨源及鵝源水禽小病毒抗體力價即可達到SN 100倍以上，注射後24小時可達SN 500倍以上，注射後10日力價仍可達國家檢定標準（SN 32倍）。以不同力價之卵黃抗體免疫鴨隻，當免疫抗體力價低於SN 1,000倍時，抗體可維持4~6日；當SN 2,000倍時可維持6-10日；當SN大於3,000倍時可維持10日以上抗體力價大於32倍（圖1、2、3）。

鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑田間委託試驗：

委託國立中興大學分別於嘉義縣正番鴨場及雲林縣土番鴨場各1場進行。雲林縣土番鴨場土番鴨7,300隻於1日齡及10日齡各注射本劑一劑量，200隻為無免疫對照，免疫前採血NI值 < 1.5，免疫注射後於2日齡、7日齡及14日齡分別帶回以野外毒1,000 LD₅₀攻毒，結果免疫組均存活未死亡亦無鴨病毒性肝炎之臨床症狀，然7、14日對照組隻死亡率未達80%（表3）。鴨群於2週齡時有異常死亡，經剖檢確認為雷氏桿菌症，經抗生素投藥後控制疫情，其體重免疫組優於對照組（30日齡時免疫組20隻平均體重1,123.3公克；對照組799.2公克），育成

率95%。

嘉義縣正番鴨場正番鴨3,800隻於1日齡及10日齡分別注射本劑一劑量，200隻為無免疫對照。免疫前採血測DHAV-1抗體 NI值 > 1.5 (平均值1.89) 為 45% (9/20) ; NI < 1.5 (平均0.95) 為55% (11/20)。注射後於2、7、14日齡分別帶回以野外毒1,000 LD₅₀ 攻毒。結果免疫組均存活未死亡亦無鴨病毒性肝炎之臨床症狀，然而2、7、14日對照組隻死亡率未達80% (表4)。於30日齡時體重無顯著差異(20隻平均體重: 免疫組2,132.6公克; 對照組2,098.9公克)，育成率99.9%。

討論

種鴨場長期以來為避免因為注射DHAV-1活毒減毒疫苗引發緊迫而造成產蛋下降，且因鴨隻移行抗體干擾DHAV-1活毒減毒疫苗造成疫苗成效不彰。鴨病毒性肝炎在雛鴨感染後36至96小時發生大量死亡，然而雛鴨於疫苗免疫後4至6日才能產生足夠的保護能力，所以DHAV-1活毒減毒疫苗應使用於種鴨而非1日齡雛鴨。目前DHV以卵黃抗體被動免疫保護雛鴨耐過對DHAV-1最具感受性的前3週，為能改善現況之方法。試驗結果顯示當以SN抗體力價200及400倍之DHAV-1卵黃抗體製劑被動免疫1日齡雛鴨，雖然於被動免疫後7日攻毒可以100%耐過，但是部分鴨隻肝臟呈現出血及脂肪肝病變，被動免疫後10日攻毒，依據鴨隻品種之差異造成10至30%死亡率。至於鴨

隻以SN抗體力價800及1,000倍之DHAV-1卵黃抗體製劑進行被動免疫後第10日，任何品種之鴨隻血清抗體力價NI值均大於3.0，鴨隻100%耐過強毒攻毒。所以為確保鴨隻於被動免疫後第10日進行補強注射前能完全耐過DHAV-1強毒感染，又考慮現場環境不同，所以建議卵黃抗體製劑之SN抗體力價需達1,000倍以上。田間試驗由於現場鴨隻來源以及飼養環境不同，造成田間試驗之變數。嘉義縣正番鴨場部分鴨隻仍帶有移行抗體，以至於2日齡攻毒時對照組死亡率沒有達到80%，另外可能因年齡增長對病毒感受性降低，以至於7日齡及14日齡攻毒對照組之死亡率均未達80%。但是仍可從田間試驗之結果得知，本製劑的安全性佳，可以提供雛鴨完整保護耐過DHAV-1之易感染期。

水禽小病毒卵黃抗體針劑原本依照鴨病毒肝炎卵黃抗體之經驗設定為1,000倍以上，然而根據不同力價抗體試驗結果顯示，無論鴨源或是鵝源水禽小病毒卵黃抗體其代謝率都較鴨病毒性肝炎卵黃抗體快，推測可能是因為以鴨蛋製成之卵黃抗體構型與以雞蛋製成之卵黃抗體不同。根據試驗結果將抗體設定在3,000倍以上，至10日齡都可維持在SN 32倍以上，於是在10日齡再肌肉注射補強一劑即可保護雛鴨耐過易感染時期。水禽小病毒卵黃抗體針劑提高抗體至3,000倍以上後可達到很好的保護效果，同時可以預防鴨源及鵝源的水禽小病毒感染，可用在正番鴨及其他鴨種之防疫。

鴨病毒性肝炎及水禽小病毒多價卵黃抗體之研發

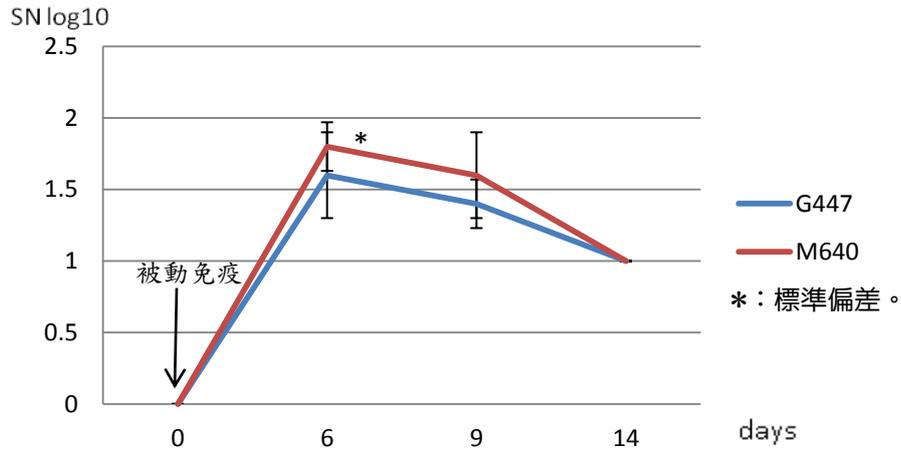


圖 1、水禽小病毒卵黃抗體針劑低抗體力價（G477：GPV SN 477 倍，M640：MDPV SN 640 倍）在菜鴨之抗體消長。

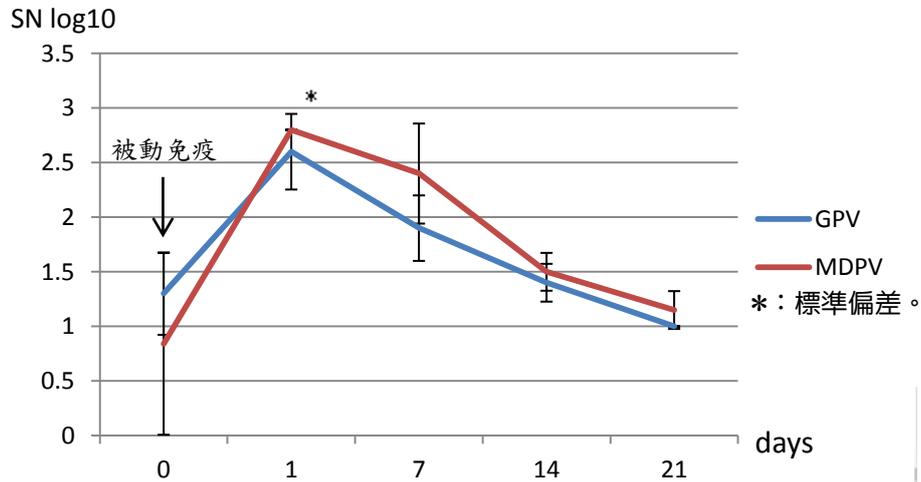


圖 2、水禽小病毒卵黃抗體針劑 GPV SN 2113 倍，MDPV SN 5120 倍在北京鴨之抗體消長。

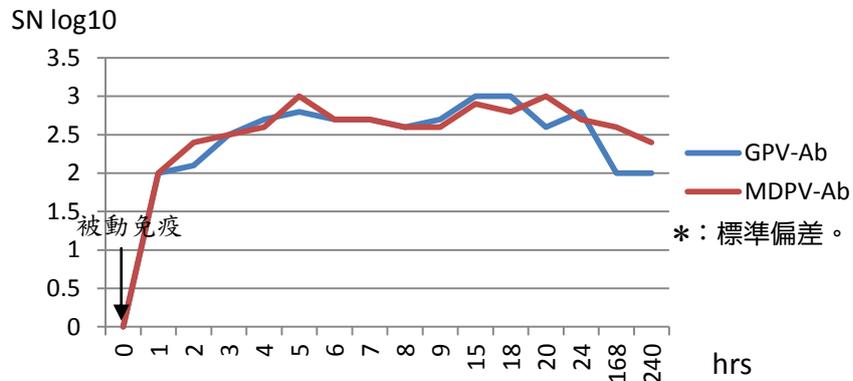


圖 3、水禽小病毒雙價卵黃抗體針劑（SN 3,200 倍）注射後之抗體消長。

表 1、「鴨病毒性肝炎卵黃抗體」及「水禽小病毒雙價卵黃抗體」安全試驗結果。

組別	鴨病毒性肝炎卵黃抗體		水禽小病毒雙價卵黃抗體	
	平均體重	<i>P value</i>	平均體重	<i>P value</i>
1 劑量	240.932	0.630968 ^a	423.56	0.746969
2 劑量	229.212	0.337362	358.34	0.097968
對照組	253.814		415.03	

^a：以 t-test 分析試驗組與對照組之 *p value* 值。

表 2、DHAV-1 卵黃抗體被動免疫鴨隻後第 7 及第 10 日抗體 NI 值及攻毒死亡率。

組別	鴨種	被動免疫後天數				
		被動免疫前	7 天		10 天	
		NI	NI	死亡率 (%)	NI	死亡率 (%)
Mu-200 ^a	土番鴨 (Mule duck)	0.67 ^b	2.90	0	2.05	10 ^c
Mu-400		0.67	3.50	0	2.67	10
Mu-800		0.67	3.72	0	3.50	0
Mu-1000		0.67	3.17	0	3.50	0
K-200	改鴨 (Kaiya duck)	0.34	2.90	0	2.34	30
K-400		0.34	3.11	0	2.50	10
K-800		0.34	3.61	0	3.25	0
K-1000		0.34	3.72	0	3.00	0

^a：Mu-200，土番鴨 (Mule) 以 SN 抗體力價 200 倍之 DHAV-1 卵黃抗體製劑肌肉注射一劑量。

^b：中和指數 (Neutralization Index, NI)。

^c：對照組：7 日齡土番鴨及改鴨攻毒死亡率為 80% 及 90%，10 日齡土番鴨及改鴨攻毒死亡率為 60% 及 100%。

鴨病毒性肝炎及水禽小病毒多價卵黃抗體之研發

表 3、田間試驗土番鴨場 DHAV-1 攻毒結果。

組別		日齡		
		12	17	24
免疫組	存活*	100	100	100
	死亡	0	0	0
對照組	存活	10	40	70
	死亡	90	60	30

備註：%

表 4、田間試驗正番鴨場 DHAV-1 攻毒結果。

組別		日齡		
		12	17	24
免疫組	存活*	100	100	100
	死亡	0	0	0
對照組	存活	60	60	70
	死亡	40	40	30

備註：%

致謝

本鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑田間委託試驗系由
國立中興大學獸醫學系協助完成，僅致謝忱。

參考文獻

1. 林茂勇。禽病檢查手冊。台北。藝軒。303-314。1995。
2. 呂榮修。禽病診斷彩色圖譜。台北，中華民國養雞協會。55-64。1995。
3. Ding C, Zhang D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology* 361: 9-17, 2007.
4. Friend M, Trainer DO. Experimental duck virus hepatitis in the mallard. *Avian Dis* 16: 692-699, 1972.
5. Lu YS, Lin DF, Lee YL, Liao YK, Tsai HJ. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in ducklings in Taiwan. *Avian Dis* 37: 591-596, 1993.
6. Lu YS. Epidemiological studies on duck viral hepatitis. *J Chinese Soc Vet Sic* 9:11-18, 1983.
7. Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W. 1990. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 71: 2141-2147.
8. Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of variant of duck hepatitis type 1 virus. *Avian Dis* 36: 932-936, 1992.
9. Todd D, Smyth VJ, Ball NW, Donnelly BM, Wylie M, Knowles NJ, Adair BM. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian pathol* 38: 21-29, 2009.
10. Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res* 123: 190-203, 2007.
11. Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res* 126: 19-31, 2007.
12. Wang LY, Pan M, Fu Y, Zhang DB. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Gen* 37: 52-59, 2008.

Development of Multivalent Immunoglobulin Y for Waterfowl's Viral Diseases

YH Shih*, CH Tseng, AP Hus, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract This purpose of this study was to develop duck hepatitis virus and waterfowl parvovirus yolk antibodies for the treatment of these viral diseases in young ducklings. The safety and effectiveness of the duck hepatitis virus IgY (DHAV-1 IgY) and waterfowl parvovirus IgY were performed by two companies. The results showed DHAV-1 IgY injections could induce good protection against duck hepatitis virus (DHAV-1) if the neutralization antibody titers were $\geq 1,000\times$, while the waterfowl parvovirus yolk antibody titers could induce good protection against waterfowl parvovirus if the neutralization antibody titers were $\geq 3,000\times$ within 10 days after injection. This indicates that the yolk neutralization antibodies of the IgY should be $\geq 1,000\times$ or $\geq 3,000\times$ for duck hepatitis virus and waterfowl parvovirus, respectively, for treatment against these two viral diseases. These IgY could be used for passive protection against duck hepatitis virus and waterfowl parvovirus during outbreak or prevention according to waterfowl industry requires.

Keywords: *duck hepatitis virus, water fowl parvovirus, immunoglobulin Y.*

