

鴨病毒性肝炎活毒減毒疫苗之研發

施雨華*、曾俊憲、許愛萍、陳瑞祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 以研發之鴨病毒性肝炎活毒疫苗，應用於種鴨可有效控制鴨病毒性肝炎之感染。結果顯示鴨病毒性肝炎活毒疫苗免疫後 10 天血清抗體力價即可達國家檢定標準。且由安全及迴毒試驗結果得知此疫苗安全性佳，由效力試驗結果得知此疫苗於免疫後 4 至 6 日即可有 80% 以上保護效力，於種鴨使用可以維持 2 個月以上血清抗體達國家檢定標準。此成果將可提供水禽產業主動免疫之免疫模式參考，提升疫苗免疫意願，將可有效預防鴨病毒性肝炎之發生。

關鍵詞：鴨病毒性肝炎、疫苗。

緒言

鴨病毒性肝炎主要發生在 4 週齡以下雛鴨的急性致死性的接觸性疾病，免疫種鴨使之產生高的移行抗體，可以保護小鴨抵抗本病[1,2]。鴨病毒性肝炎可由三種鴨肝炎病毒(duck hepatitis virus, DHV)引起，病原分別為鴨星狀病毒一型及二型(duck astrovirus type 1 and 2)及鴨肝炎 A 病毒(Duck hepatitis A virus; DHAV)[7,12]。DHAV 是分布最廣、病原性最強的鴨肝炎病毒則是鴨肝炎 A 病毒，於 1948 年首先在美國紐約長島由 Levene 及 Fabricant 報告，臺灣則分別於 1972 與 1990 年發生兩次大流行[4,6]。DHAV 屬於 *Picornaviridae* 中的 *Avihepatovirus* 病毒屬 [3,8]。DHAV 可再區分為三個血清型別：DHAV-1、DHAV-2、DHAV-3 [5,9,12]。DHAV-1 是分布最廣的，DHAV-2 只發生在臺灣，DHAV-3 則發生在韓國以及中國 [10,11]。DHAV 的發病率可達 90% 以上，而死亡率則依年齡不同及鴨隻品種不同對於 DHAV 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。

鴨病毒性肝炎活毒疫苗雖然有商品化產品可供種禽免疫，然而施打疫苗可能造成緊迫使得種禽產蛋下降，因而減低農戶免疫的意願。而本研究擬開發用於預防鴨病毒性肝炎之活毒疫苗並證明其安全性以及效

力，並且提供免疫模式的建立，提供養禽業者主動免疫之參考，提升疫苗免疫之意願，降低使用卵黃抗體之成本，並且也效降低本病於台灣之發生率。

材料方法

一、病毒馴化及疫苗製備：

本 N895 疫苗株係以 2005 年野外病例分離之強毒株，經以無特定病原雞胚胎連續馴化 72 代之減毒活毒疫苗種毒株，鴨病毒性肝炎活毒疫苗係屬 DHAV-1，是針對 DHAV-1 防疫用。以 DHAV-1 N895 病毒為種毒株，接種 SPF 雞胚胎蛋，將大量增殖之胚胎尿囊液及胚胎，經均質、離心後之病毒液，經冷凍乾燥後於 2~8℃ 保存，為 DHAV-1 活毒疫苗。

O9D-1 疫苗株為 2009 年野外病例分離株，經以清淨鴨胚連續馴化 32 代之種毒株。以 DHAV-1 O9D-1 病毒接種清淨鴨胚胎蛋，將大量增殖之胚胎尿囊液經離心後之病毒液，經不活化後與佐劑混合為 DHAV-1 死毒疫苗。

二、病毒含量試驗：

疫苗以磷酸緩衝食鹽水 100 mL 將其溶解後，抽出一劑量以磷酸緩衝食鹽水進行 10 倍階段連續稀釋，每一稀釋階段各注射五個 7-9 日齡雞胚胎尿囊腔，繼續於 37℃ 培養 7 天測定其 EID₅₀，記錄 24 小時後至第

7天內死亡胚胎，且在7天內未死者仍應剖檢有無本病毒引起之特徵病變，有病變者即以感染雞胚胎計算。結果每劑量之病毒含量須在 $10^{3.5}$ EID₅₀/dose以上。

三、安全試驗：

以 $10^{7.0}$ EID₅₀鴨肝炎活毒疫苗經肌肉注射接種方式免疫1日齡低DHAV-1抗體(Neutralization Index；NI<1.5)健康番鴨、土番鴨、改鴨各10隻，於注射後觀察21天，本產品接種鴨隻必須無死亡、下痢或其他臨床症狀產生而健存，體重以T檢定計算P值，比較免疫組與對照組是否具有差異。

四、效力試驗：

1日齡低DHAV-1抗體(NI <1.5)健康北京鴨、菜鴨、土番鴨、櫻桃鴨每5隻鴨分為一組試驗組，以DHAV-1疫苗肌肉注射1劑量，另外取5隻為對照組不免疫，於免疫後1~6日每天分別以鴨病毒性肝炎強毒(O8D strain)肌肉注射1,000 LD₅₀攻毒，於攻毒後觀察7日並記錄死亡數，免疫組存活率需80%以上判定具保護效力。

五、迴毒試驗：

將疫苗病毒 $10^{5.0}$ EID₅₀以肌肉注射接種1日齡低DHAV-1抗體(NI<1.5)番鴨5隻，接種後第5日犧牲鴨隻採肝臟、脾臟及腎臟，以磷酸緩衝食鹽水均質製成10倍乳劑，於4°C以3,500rpm離心20分鐘，取乳劑上清液再接種下一代。連續迴毒5代，迴毒第5代之病毒額外接種10隻1日齡番鴨，觀察21天是否有死亡、下痢或其他臨床症狀產生。每代接種前以即時反轉錄核酸聚合酶鏈鎖反應(real time RT-PCR)檢測病毒核酸。

六、免疫適期抗體消長試驗：

將DHAV-1疫苗以 $10^{3.5}$ EID₅₀免疫1日齡健康番鴨、土番鴨及改鴨，試驗組分為三組：分別於免疫後5日、7日或10日進行補強免疫。免疫後定期3至4天採血測定抗體，將血清經56°C非動化30分鐘後，以Hank's磷酸緩衝液行10倍稀釋，另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37°C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為未具中和能力，以此判定DHAV-1中和抗體力價，NI值>3.0即具保護效力。

七、種鴨免疫適期試驗：

6月齡番鴨分為四組：(1) 每隻鴨肌肉注射免疫1劑量活毒疫苗，3天補強活毒1劑量。(2) 每隻鴨肌肉注射免疫1劑量活毒疫苗，7天補強活毒1劑量。(3) 每隻鴨肌肉注射免疫1劑量活毒疫苗，7天補強鴨病毒性肝炎死毒疫苗1劑。(4) 每隻鴨肌肉注射免疫1劑量活毒疫苗，14天補強鴨病毒性肝炎死毒疫苗1劑。定期翼靜脈採血，將其血清以病毒中和試驗測定抗體力價。

結果

一、安全試驗、效力試驗：

安全試驗以 10^7 EID₅₀免疫番鴨、土番鴨、改鴨觀察21日，結果顯示試驗組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鴨病毒性肝炎引起肉眼病變。於21日齡時試驗組番鴨、土番鴨、改鴨平均體重分別為 $297.4g \pm 61.2g$ 、 $342.6g \pm 46.1g$ 、 $283.25g \pm 49.5g$ ；對照組體重分別為 $284.9g \pm 101.1g$ 、 $352.7g \pm 50g$ 、 $289.8g \pm 30.1g$ ，免疫組及對照組以T檢定計算P-value 分別為0.51、0.40、0.43無顯著差異。

效力試驗以1劑量免疫鴨隻，1~6日攻毒，結果顯示不同鴨種可於4~6日產生80%保護效力，北京鴨於接種後5日有80%以上保護效力，土番鴨於接種後4日有80%以上保護效力，櫻桃鴨則於免疫後第6天可有80%以上保護效力，菜鴨則於免疫後第6天可有60%以上保護效力(表1)。

二、迴毒試驗：

迴毒試驗5代，每代均以real time RT-PCR偵測到病毒核酸才接種下一代，第1~4代於5天內均無死亡或任何不良反應，第5代觀察21天，免疫前試驗組

及對照組體重分別為 $43g \pm 5.4g$ 、 $39g \pm 5.8g$ ；於免疫後第21天體重免疫前試驗組及對照組體重分別為 $291.8g \pm 35g$ 、 $281g \pm 26g$ ，以T檢定計算P-value 0.44無顯著差異。

三、免疫適期抗體消長試驗：

改鴨於基礎免疫後7天可以達到NI 3.0以上（圖1）。土番鴨於免疫後10天可以達到NI 3.0以上（圖2）。番鴨於免疫後7天可以達到NI 3.0以上，由結果顯示於番鴨免疫於免疫一次後7日即可達到保護效力（圖3）。

四、種鴨免疫適期試驗：

種鴨於免疫後10日皆可以達到NI3.0以上，並維持2個月以上，活毒疫苗與死毒疫苗互相配合使用，可使抗體維持150日以上NI>3.0（圖4）。

討論

鴨病毒性肝炎自1949年報告以後，在世界各地皆有病例。臺灣雖然有兩型鴨病毒性肝炎DHAV-1以及DHAV-2，然而主要病例仍然是DHAV-1所引起。臺灣目前市面上有鴨病毒性肝炎活毒疫苗，然而因為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，所以疫苗施打率並不高。從2008年開始DHAV-1卵黃抗體製劑普遍使用被動免疫保護雛鴨耐過對DHAV-1最具感受性的前3週，能夠快速控制疫情以及具有顯著療效，但是每隻雛鴨皆須施打卵黃抗體而增加飼養的成本。依據鴨病毒性肝炎疫苗保護效力的結果顯示，在雛鴨感染後36至96小時發生大量死亡，疫苗於免疫後4至6日才能產生足夠的保護能力，依據鴨種的不同，產生的效力亦不

同。以菜鴨而言相同的鴨病毒性肝炎疫苗劑量免疫後6天攻毒，有60%保護效力，而其他鴨種於免疫後4至6日即有80%保護效力，由此可知在雛鴨要使用疫苗作為疾病預防必須要最少要4至6日才可以產生保護效力，因此本疫苗應使用於種鴨而非1日齡雛鴨。雖然如此，但由免疫適期抗體消長試驗結果得知，在番鴨一次免疫即可達到NI>3.0，在其他鴨種則需補強一劑，然而無論是5天、7天、10天補強都可以達到有效的中和抗體力價，也顯示了本疫苗製劑具有良好的保護效力。而由安全試驗以及迴毒試驗也可得知本製劑的安全性佳。

開發有效的鴨病毒性肝炎疫苗以及建議完整免疫模式，提倡種鴨進行免疫使其產生高的移行抗體保護雛鴨耐過疾病易感染時期，才是根本預防疾病方式，可以有效降低飼養成本並預防疾病。由種鴨免疫試驗結果顯示，以活毒疫苗在種鴨免疫可以達到足夠的抗體標準，產生足夠移行抗體保護雛鴨，種鴨抗鴨病毒性肝炎抗體可以維持2個月以上。然而搭配死毒疫苗的使用，不但可以達到更高的抗體水平，並且抗體水平可以維持更長的時間，因此以鴨病毒性肝炎活毒疫苗搭配死毒疫苗製劑進行產蛋前免疫，可以有效使種鴨產高力價抗體，所產雛鴨也能維持高移行抗體而耐過疾病易感染時期，開發死毒疫苗配合活毒疫苗使用是未來目標。

誌謝

感謝行政院農業委員會計畫「鴨病毒性肝炎活毒疫苗和新城病第VII基因型活毒疫苗之研發與商品化」經費提供，計畫編號：103農科-6.2.2-衛-H1。

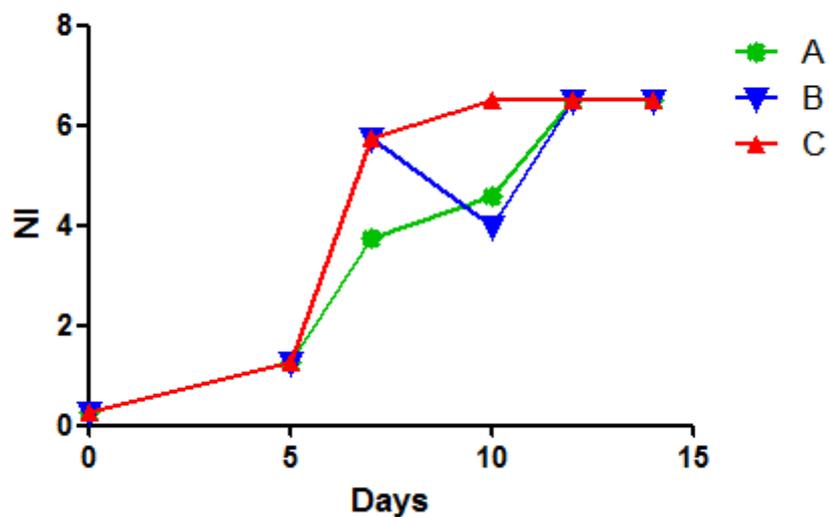


圖 1、1日齡改鴨DHAV-1疫苗免疫後抗體消長。A：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後5日補強；B：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後7日補強；C：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後10日補強。

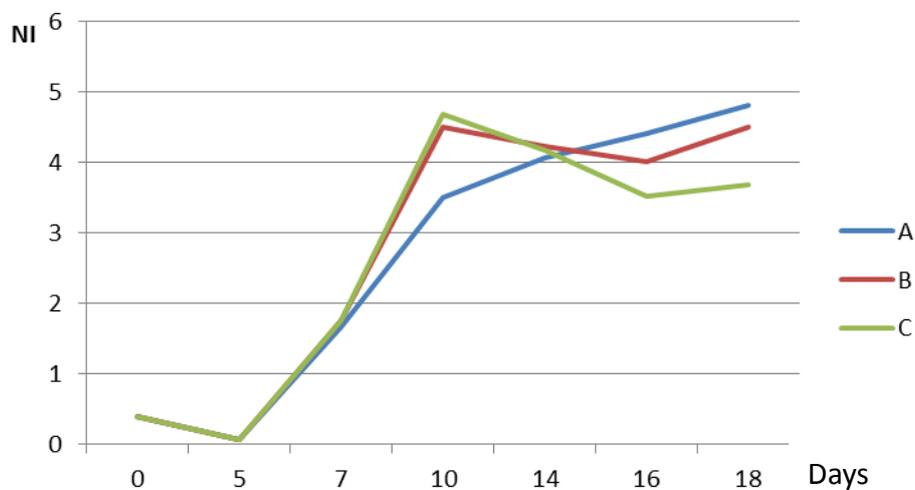


圖 2、1日齡土番鴨DHAV-1疫苗免疫後抗體消長。A：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後5日補強；B：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後7日補強；C：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後10日補強。

鴨病毒性肝炎活毒疫苗之研發

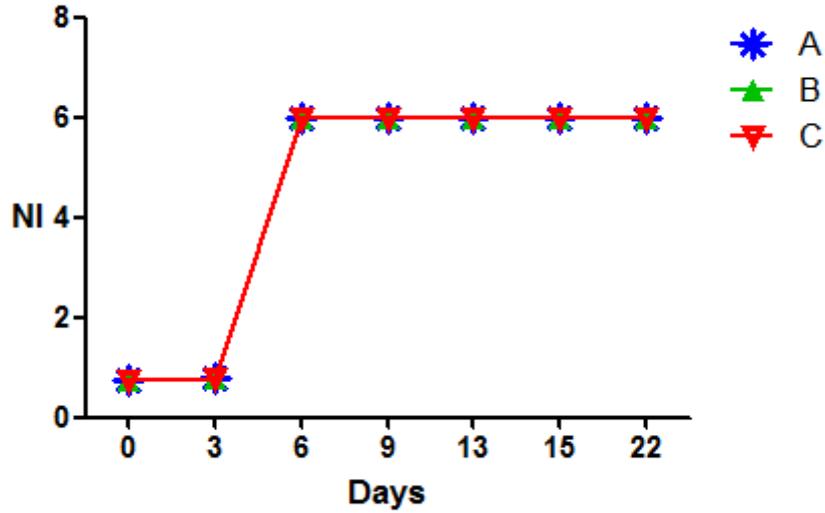


圖3、1日齡番鴨DHAV-1疫苗免疫後抗體消長。A：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後5日補強；B：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後7日補強；C：於1日齡免疫疫苗一劑量，並於免疫後10日補強。

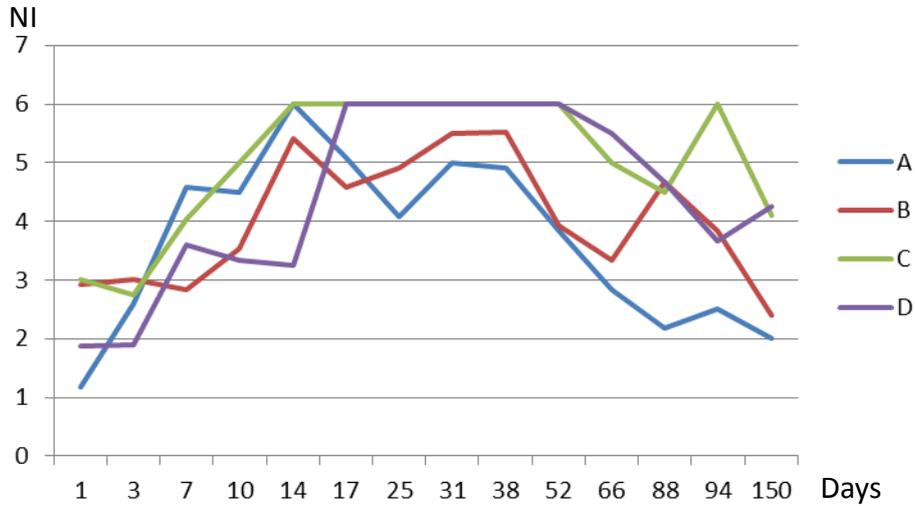


圖4、種鴨免疫適期。A：以肌肉注射每隻鴨免疫1劑量活毒製劑，3天補強；B：以肌肉注射每隻鴨免疫1劑量製劑，7天補強；C：以肌肉注射每隻鴨免疫1劑量製劑，7天補強鴨病毒性肝炎死毒疫苗一劑；D：以肌肉注射每隻鴨免疫1劑量製劑，14天補強鴨病毒性肝炎死毒疫苗一劑。

表 1、不同鴨種於疫苗免疫後不同天數之保護效力。

鴨種	組別	死亡率(%) (死亡隻數/攻毒隻數)					
		1 dpi ^a	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi
北京鴨	試驗組	100(5/5)	80(4/5)	60(3/5)	60(3/5)	0(0/5)	60(3/5)
	對照組	80(4/5)	40(2/5)	80(4/5)	60(3/5)	100(5/5)	100(5/5)
萊鴨	試驗組	80(4/5)	100(5/5)	60(3/5)	80(4/5)	60(3/5)	40(2/5)
	對照組	100(5/5)	100(5/5)	100(5/5)	80(4/5)	60(3/5)	80(4/5)
土番鴨	試驗組	100(5/5)	60(3/5)	60(3/5)	20(1/5)	20(1/5)	20(1/5)
	對照組	100(5/5)	60(3/5)	60(3/5)	80(4/5)	60(3/5)	100(5/5)
櫻桃鴨	試驗組	100(5/5)	80(4/5)	80(4/5)	80(4/5)	40(2/5)	0(0/5)
	對照組	100(5/5)	80(4/5)	100(4/5)	80(4/5)	80(4/5)	100(5/5)

^a:免疫後天數。

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. Fu Y, Pan M, Wang X, Xu Y, Yang H, Zhang D. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Vet Microbiol* 131: 247-57, 2008.
5. Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, Kim SJ, Tolf C, Kim JH. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Arch Virol* 152:2059-72, 2007.
6. Levine P, Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America. *Cornell Vet* 40: 71-86, 1950.
7. Lu YS. Epidemiological studies on duck viral hepatitis. *J Chinese Soc Vet Sci* 9:11-18, 1983.
8. Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, Khan MA, Pasca A, Stanway G, Al-Nakib W. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 71: 2141-2147, 1990.
9. Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis* 36: 932-936, 1992.
10. 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.
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 Duck Viral Hepatitis Attenuated Vaccine

YH Shih^{*}, CH Tseng, AP Hsu, RS Chen

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract We have developed a duck viral hepatitis attenuated vaccine to control duck viral hepatitis in domestic duck farms. Antibody titers reached significant levels 10 days post DHAV-1 vaccination, indicating that the vaccine was capable of eliciting effective responses in ducks. The vaccine was found safe with 80% protection efficiency 4 to 6 days post-immunization. Over 2 months post vaccination, the antibody titers from treated domestic ducks were measured to be at or above levels mandated by national animal health standards. This vaccine therefore has been cleared for application on domestic ducks for controlling duck viral hepatitis.

Keywords: *Duck hepatitis A virus, vaccine*

