



鴨病毒性肝炎病毒 卵黃抗體的生產與製造

施雨華 本所製劑研究組

摘要

鴨病毒性肝炎（duck viral hepatitis；DVH）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。自 2008 年 6 月開始，臺灣陸續發生雛鴨大量死亡之疫情，可能是因為長期以來以卵黃抗體被動免疫雛鴨進行鴨病毒性肝炎之防疫，但因卵黃抗體目前尚無商品化產品，停用後以致於爆發本次疫情。本所研發之高力價卵黃抗體每劑量為 0.5 mL，雛鴨於 1 日齡及 10 日齡各注射本劑 1 劑量，可以有效保護雛鴨耐過鴨肝炎 A 病毒 1 型血清型（duck hepatitis A virus-1；DHAV-1）強毒感染，亦不會影響鴨隻發育。故本製劑具高度安全性及效力，未來應用於田間將可有效控制鴨病毒性肝炎對鴨隻之危害。

緒言

鴨病毒性肝炎主要感染 6 週齡以下雛鴨，尤其是對 3 週齡以下雛鴨會造成高死亡率。本病於 1948 年首先在美國紐約長島由 Leviene 及 Fabricant 報告，臺灣則分別於 1972 與 1990 年發生兩次大流行。鴨病毒性肝炎病毒依據血清學可區分成 DHV-I、II、III 三型。目前 DHV-II 只發生於英國，DHV-III 只於美國有發生報告，病原同為星狀病毒科（Astroviridae）。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）。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與肝細胞壞死。於 2007 年有關新血清型鴨肝炎病毒（new serotype DHV；N-DHV）之相關文獻陸續發表，證實 N-DHV 與 DHV-I 均屬於 DHAV，但彼此不具抗原相關性，故將 DHV-I 分類為 DHAV-1、DHAV-2 及 DHAV-3 三種血清型。DHAV-1 即原本之 DHV-I，而 DHAV-2 及 DHAV-3 均屬於 N-DHV，其中 DHAV-2 僅台灣有病例報告，DHAV-3 目前僅發生於中國與韓國。自 2008 年 6 月開始，臺灣中南部陸續發生雛鴨大量死亡之疫情，並非 DHAV-2 或 DHAV-3 入侵造成，而是本土型 DHAV-1 爆發所致。推測本次疫情可能是因為種鴨場為了避免鴨隻因注射 DHAV-1 疫苗而引發緊迫造成產蛋率下降，所以改以卵黃抗體被動免疫雛鴨進行鴨肝炎之防疫，但是因為卵黃抗體目前尚無商品化產品，停止使用後造成爆發本次疫情。

農政主管機關於 2009 年許可緊急防疫用之抗 DHAV-1 卵黃抗體製劑生產與使用，以控制 DVH 疫情。但是幾批緊急防疫用之抗 DHAV-1 卵黃抗體製劑其 SN（serum neutralization）抗體力價均低於 1,000 倍，雖然可被動保護鴨隻耐過強毒感染存活下來，但是依據試驗結果顯示，因為卵黃抗體力價不足時仍會影響感染鴨隻發育，造成無形之損失。本所研發之卵黃抗體製劑其 SN 抗體力價均達 1,059 倍以上，每劑量為 0.5 mL，雛鴨於 1 日齡及 10 日齡各免疫 1 劑量，可以有效保護雛鴨耐過 DHAV-1 強毒感染，亦不會影響鴨隻發育。故本製劑具高度安全性及效力，未來應用於田間將可有效控制鴨病毒性肝炎對鴨隻之危害。

材料方法

- 一、卵黃抗體製成：以抗 DHAV-1 病毒之 SN 抗體力價達 20,480 倍以上母雞生產之雞蛋卵黃，經萃取抗體、添加最終濃度 0.2%（v/v）之福馬林防腐並稀釋後製成 SN 抗體力價達 1,000 倍以上之卵黃抗體製劑。
- 二、安全試驗：選 1 日齡健康小鴨 20 隻分成 3 組，第 1 組 5 隻，每隻各肌肉注射本劑 1 劑量，第 2 組 10 隻，每隻各肌肉注射本劑 2 劑量，第 3 組 5 隻為未注射對照。於注射後觀察 10 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。
- 三、效力試驗：選取 1 日齡低 DHAV-1 抗體之健康小鴨 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，每組分別取 10 隻以 DHAV-1 強毒肌肉注射攻擊 (1,000 LD₅₀)，於攻擊後連續觀察 10 天。結果試驗組之存活率需達 80% 以上，對照組之死亡率需達 80% 以上。
- 四、安定性試驗：試製之卵黃抗體製劑於 4 °C 保存，每間隔 3 個月取 3 瓶，經等量混合後進行 SN 抗體力價測定試驗。
- 五、卵黃抗體製劑抗體力價與抗體消長及保護力關聯性試驗：1 日齡土番鴨和改鴨，每種品系鴨隻 40 隻為 1 組。鴨隻以 SN 抗體力價 200、400、800 及 1000 倍之 DHAV-1 卵黃抗體製劑肌肉注射 1 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，檢測抗體力價 (neutralization index ; NI)。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。
- 六、卵黃抗體製劑於不同鴨隻品種之抗體消長試驗：抗體力價 NI 值小於 1.5 之 1 日齡萊鴨、櫻桃鴨各 200 隻。試驗前各取 4 隻小鴨肝臟製成 10% 乳劑，以 RT-PCR 反應確定小鴨未感染 DHAV-1 病毒。DHAV-1 卵黃抗體稀釋成 SN 力價 1,000 倍及緊急防疫用 SN 力價 120 倍之抗體，以肌肉注射 0.5 mL 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及病毒中和試驗，探討被動免疫後抗體消長情形。
- 七、卵黃抗體力價與攻毒試驗鴨隻體重之關聯性探討：抗體力價 NI 值小於 1.5 之 1 日齡萊鴨 80 隻。試驗前取 4 隻小鴨肝臟製成 10% 乳劑，以 RT-PCR 反應確定小鴨未感染 DHAV-1 病毒。本所 DHAV-1 卵黃抗體稀釋成 SN 力價 1,200 倍與緊急防疫用 SN 力價 120 倍之抗體，以肌肉注射 0.5 mL 被動免疫每隻鴨。取 70 隻 1 日齡萊鴨，每組 10 隻，第 1、2 組為雛鴨以卵黃抗體製劑被動免疫時同時肌肉注射 1,000 LD₅₀ DHAV-1 強毒株攻毒，模擬現場被動免疫時同時感染，第 3、4 組為被動免疫卵黃抗體後 4 小時攻毒，模擬雛鴨於飼養現場被動免疫後再感染 DHAV-1 強毒，第 5、6 組為鴨隻攻毒後 24 小時再被動免疫卵黃抗體，模擬雛鴨在種鴨場破殼器內即感染 DHAV-1 病毒，待破殼器孵化 1 日後於鴨隻出售前再予以卵黃抗體被動免疫。第 1、3、5 組被動免疫本所試製 SN 力價 1,200 倍卵黃抗體、第 2、4、6 組被動免疫 SN 力價 120 倍卵黃抗體，對照組鴨隻未被動免疫卵黃抗體亦無攻毒。每組皆飼養於相同尺寸之鴨籠，於 1、4、7、11 日齡時以電子磅秤量秤鴨隻體重。

試驗結果

- 一、成品生產製造：試製 Lot 9801、9802 及 9803 三批 DHAV-1 卵黃抗體製劑，原液及成品檢驗結果 SN 力價均達 1,059 倍以上，於 2~8°C 保存 15 個月後抗體力價無下降，無菌、防腐劑檢驗均符合規定，安全及效力試驗結果被動免疫組鴨隻皆健存，無不良反應（表 1），顯示本卵黃抗體製劑具高度安定性及效力。
- 二、卵黃抗體製劑抗體力價與抗體消長及保護力關聯性：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 1 劑量後，第 10 日其抗體 NI 值均高於 3.0（表 2），SN 抗體力價 800 倍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%，故為確保卵黃抗體製劑於田間應用之效果，卵黃抗體製劑之 SN 抗體含量應達 1,000 倍以上為宜。
- 三、卵黃抗體製劑於不同鴨隻品種之抗體消長：菜鴨以本所 DHAV-1 卵黃抗體製劑（SN1,000 倍）被動免疫後 1 小時，抗體 NI 值即可達 4.0，且抗體 NI 值至被動免疫後第 9 天仍可維持於 NI 4.11 以上（圖 1）。櫻桃鴨以卵黃抗體製劑被動免疫後 19 日之抗體 NI 值仍可維持於 NI 3.0 以上（圖 2）。緊急防疫用 DHAV-1 卵黃抗體製劑（SN120 倍）須至免疫後 3 小時抗體 NI 值才可達 3.0，而且只能維持至被動免疫後第 7 天（圖 1、圖 2）。根據本實驗室先前病毒中和能力的探討，NI 值須達 3.0 才能保護雛鴨 80% 以上耐過強毒株攻毒，因此以 NI 3.0 作為保護力判定標準。
- 四、卵黃抗體力價與攻毒試驗鴨隻體重之關聯性：SN 抗體力價 1,200 倍之卵黃抗體試驗組（第 1、3、5 組）攻毒後，所有鴨隻均耐過，SN 抗體力價 120 倍卵黃抗體被動免疫之第 6 組，鴨隻死亡率達 40%。此外除了第 6 組因為飼養空間及飼料量增加造成鴨隻平均體重與第 5 組無明顯差異外，所有高抗體力價卵黃抗體被動免疫鴨隻平均體重明顯優於低抗體力價組（圖 3）。高抗體力價卵黃抗體免疫組和低抗體力價組鴨隻體重呈顯著差異（ $p=0.045$ ），低抗體力價組和對照組鴨隻體重呈極顯著差異（ $p=0.08$ ），高抗體力價組和對照組鴨隻體重沒有顯著差異（ $p=0.382$ ）。

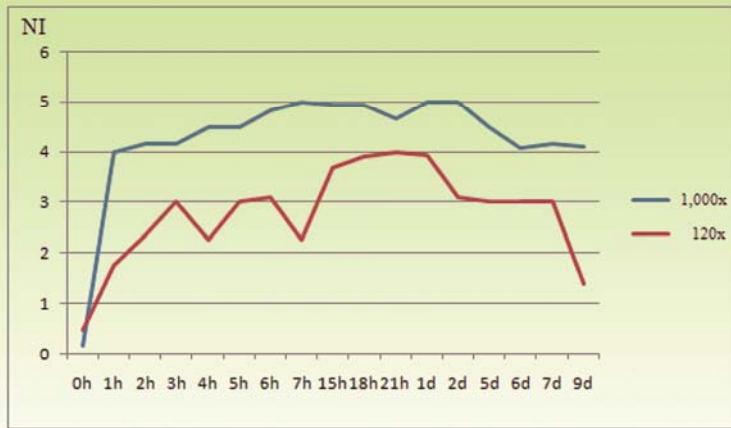


圖 1、菜鴨以不同力價 DHAV-1 卵黃抗體製劑被動免疫之抗體 (NI) 消長。

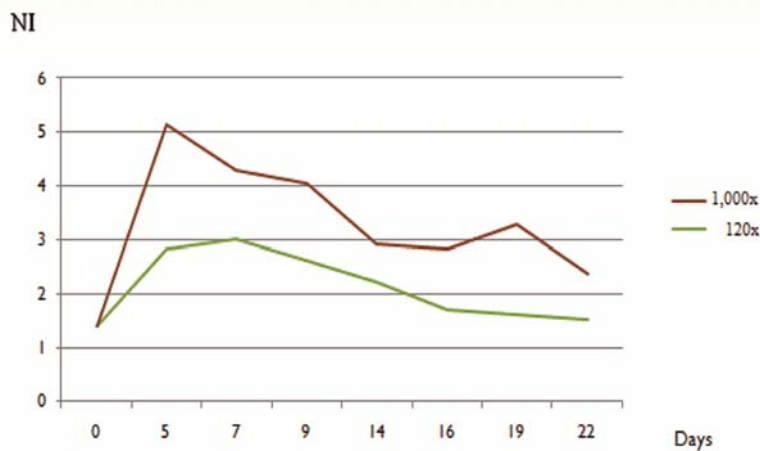


圖 2、櫻桃鴨以不同力價 DHAV-1 卵黃抗體製劑被動免疫抗體 (NI) 消長。

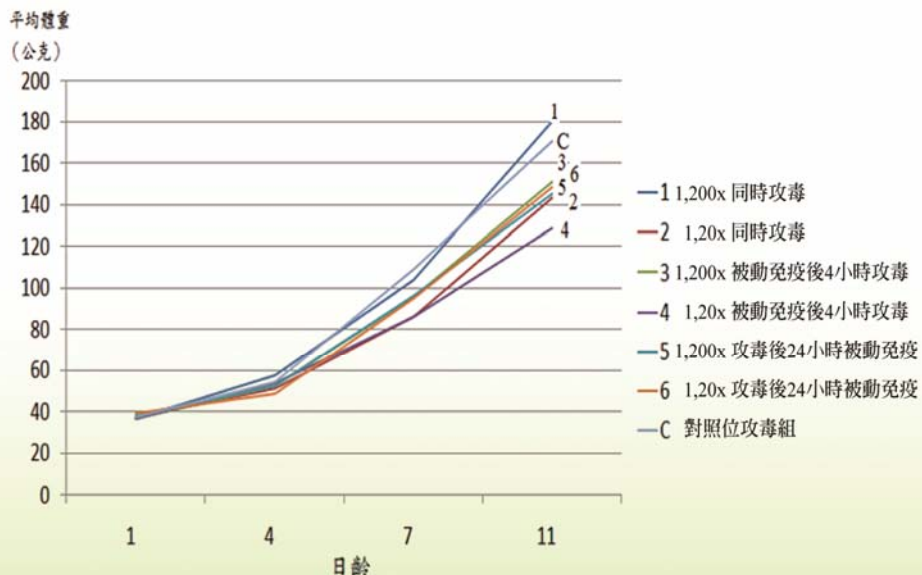


圖 3、各組鴨隻日平均體重曲線圖。

表 1、試製鴨病毒性肝炎病毒卵黃抗體成品檢驗結果總表

試驗項目	試驗結果		
	9801 ^a	9802	9803
SN 抗體力價	1,280×	2,113×	1,059×
特性試驗	0/10 ^b	0/10	0/10
防腐劑含量 (Formalin)	<0.2%	<0.2%	<0.2%
無菌試驗	TGC ^c	0/4	0/4
	SBDA ^d	0/4	0/4
迷入否定試驗	0/1	0/1	0/1
安全試驗	20/20 ^e	20/20	20/20
效力試驗	20/20 ^f	20/20	20/20
安定性試驗	6 ^g	1,059× ^h	2,113×
	11	1,059×	2,113×
	15	1,280×	2,560×

^a：製造批號。

^b：分母為取樣瓶數，分子為異常瓶數。

^c：Thioglycolate medium。

^d：Sabouraud Dextrose Agar。

^e：分母為試驗隻數，分子為正常隻數。

^f：分母為試驗隻數，分子為耐過攻毒隻數。

^g：4℃ 保存時間（月數）。

^h：SN 抗體力價。

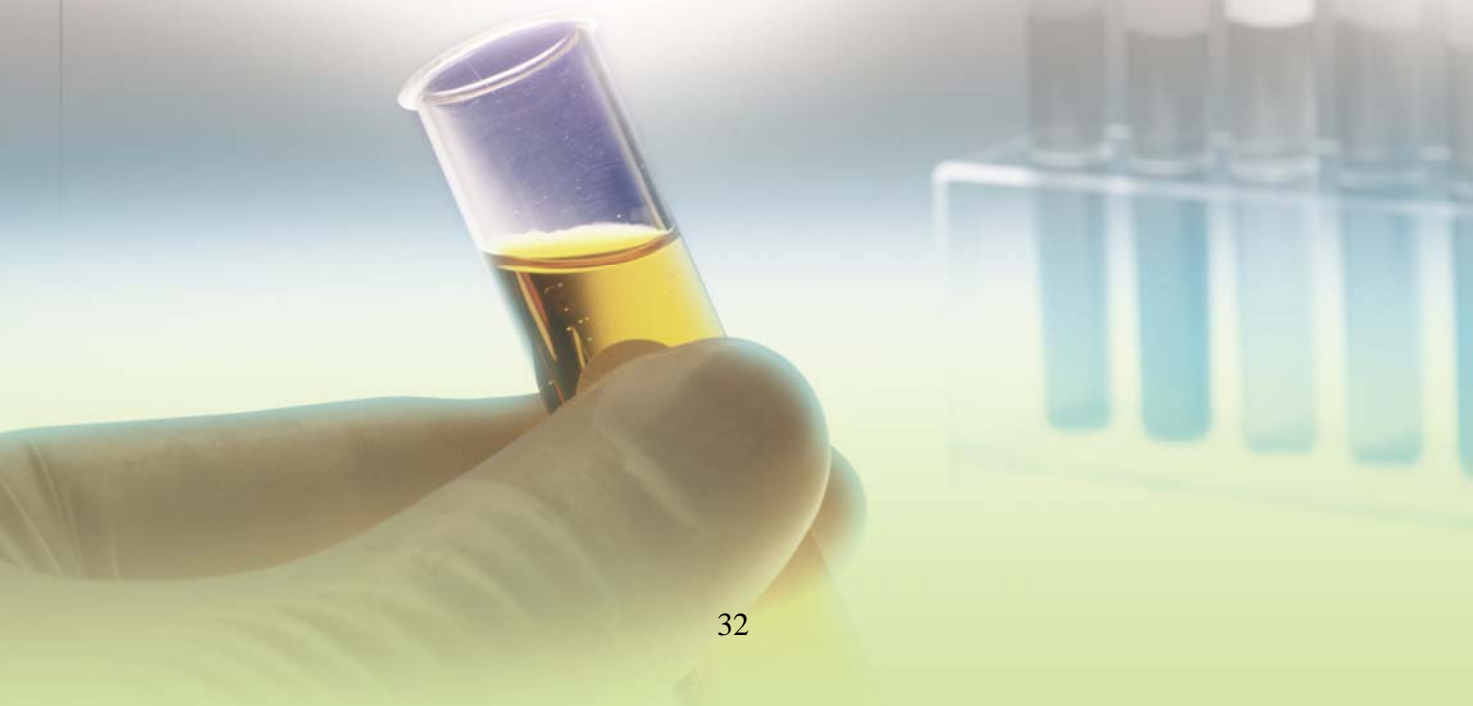


表 2、卵黃抗體被動免疫鴨隻後第 7 及第 10 日抗體 NI 值及攻毒死亡率。

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、Mu-400、Mu-800、Mu-1000 和 K-200、K-400、K-800 和 K-1000，分別代表土番鴨 (Mule) 和改鴨 (Kaiya) 經以 SN 抗體力價 200、400、800 和 1,000 倍之 DHAV-1 卵黃抗體製劑肌肉注射 1 劑量組。

^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%。

結論

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，而採卵黃抗體被動免疫雛鴨進行鴨肝炎之防疫，但因卵黃抗體目前尚無商品化產品以至於爆發 2008 年疫情。雛鴨於感染後 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 DVH 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。然仍應推廣種鴨免疫疫苗方能有效提升雛鴨移行抗體，保護雛鴨耐過易感時期，有效控制本病發生。

依據本試驗結果顯示，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。由於田間當鴨隻以卵黃抗體被動免疫後，鴨隻雖然耐過 DHAV-1 感染，但是否會因為卵黃抗體力價高低而造成鴨隻增重之差異性，這是對於養禽戶另一重要考量。依照試驗結果顯示，卵黃抗體力價高低對鴨隻生長具有顯著的影響，當以高抗體力價卵黃抗體製劑（SN 1,200 倍）被動免疫組耐過強毒感染後鴨隻平均體重均明顯優於低抗體力價組（SN 120 倍）（ $p=0.045$ ），而且與對照組鴨隻平均體重不具統計學上之差異性（ $p=0.382$ ），但是低抗體力價組與對照組鴨隻平均體重為極顯著差異（ $p=0.08$ ）。所以為確保田間鴨隻耐過 DHAV-1 強毒株感染後生長發育不受影響，必須使用高力價的卵黃抗體。根據試驗結果，本所開發卵黃抗體製劑每劑量 0.5 mL，雛鴨於 1 日齡及 10 日齡各注射本劑 1 劑量，可以有效保護雛鴨耐過 DHAV-1 強毒感染亦不會影響鴨隻發育。本製劑具高度安全性及效力，未來應用於田間將有效控制鴨病毒性肝炎對鴨隻之危害。

