



雛鵝早期免疫 水禽小病毒疫苗試驗

陳燕萍、涂央昌、李淑慧 本所疫學研究組

前言

水禽小病毒感染症 (Waterfowl Parvovirus Infection)，為一高度傳染性與致死性疾病，臨床上會引起纖維索性壞死性腸炎，世界上許多國家都曾發生並造成經濟上嚴重損失 [Gough, 2003]。臺灣首例鵝小病毒感染症於 1983 年被報告 [張等, 1983]；此外，於 1989 年由番鴨分離到類似鵝小病毒感染症之另一型病毒，稱為番鴨小病毒 (Muscovyduck Parvovirus；MDPV)，MDPV 在宿主性、抗原性及序列上均異於前者 [呂, 1995]。鵝小病毒 (Goose Parvovirus；GPV) 對鵝及番鴨均有高病原性，主要病徵為腸炎，感染率及死亡率甚高；MDPV 對鵝隻並無病原性，然所有鴨品系對 MDPV 均有感受性，其特徵為病鴨軟腳、癒後發育不良及短嘴，死亡率也高達 70% 以上 [Gough, 2003；Woolcock, et al, 2000；Palya et al, 2009]。本病潛伏期約 3 ~ 5 日，病禽初呈沈鬱、垂翼、食慾減退、不喜走動、聚集在一起、精神萎靡、閉眼嗜眠、縮頸、行動逐漸遲鈍、軟腳易轉倒、橫臥、蹲下、嘔吐、排出黃白色或水樣性下痢便、肛門污穢、羽毛潮濕、腳脫水，有些病例則呈現有流淚、流鼻水、甩頭及眼結膜充血。一般小鴨發病後約在 10 小時內開始死亡，3 ~ 4 日死亡為最多，至發病 7 日後死亡殆盡。依感染的日齡大致可分為 (1) 急性型：感染小鵝或小鴨呈步行困難及水樣性下痢而急死。(2) 亞急性型：3 週齡小鵝或小鴨呈食慾不振、脫毛、衰弱而死亡。(3) 遲發型：7 週齡前後的鵝或鴨隻發病後引起腸炎、發育停止、脫毛，死亡率較低。本病對 5 週齡以內的小鵝及小鴨的

死亡率可達 45 ~ 100%，幼齡者幾乎高達 100%。因此，本病之防疫策略以免疫健康種鴨、鵝，藉由移行抗體保護雛鵝、雛鴨預防水禽小病毒之感染。然而水禽業者常未依疫苗仿單之建議而採錯誤防疫方式免疫雛鵝、雛鴨，而有不良影響之說法。為釐清前述現象，爰進行本試驗模擬田間於雛鵝施打水禽小病毒疫苗並感染野外毒，比較雛鵝有無施打疫苗之差異。

材料與方法

雛鵝：29 隻 1 日齡雛鵝購自某一民間種鵝場，每隻鵝戴上腳環給予編號，飲水與飼料任飼。

試驗設計：雛鵝隨機分為 4 組，第 1 組與第 2 組各 8 隻、第 3 組 7 隻與第 4 組 6 隻雛鵝，飼養於同一動物舍空間中，分組分籠高架飼養。第 1 組為疫苗施打與攻毒組、第 2 組為疫苗施打組、第 3 組為攻毒組、第 4 組為未處理組。疫苗施打為於雛鵝 2 日齡時，肌肉注射由本所生產之水禽小病毒活毒疫苗，每隻 1 劑量；攻毒為於 5 日齡時，肌肉注射鵝源小病毒野外毒 $10^{4.5}$ ELD₅₀/mL，每隻 0.2 mL。每天觀察臨床症狀與死亡情形，於疫苗施打前、攻毒前與攻毒後第 2、4、7、10 與 14 天採集肛拭以聚合酶鏈鎖反應（Polymerase Chain Reaction；PCR）檢測鵝源小病毒核酸；於疫苗施打前、攻毒前與攻毒後第 14 天採集血液以中和試驗檢測血清中鵝源小病毒抗體；於攻毒前、攻毒後第 2、4、7、10 與 14 天秤量鵝隻體重。未死亡鵝隻於攻毒後 14 天（19 日齡）進行安樂死犧牲，所有鵝隻臟器進行 PCR 檢測鵝源小病毒核酸。

中和試驗：將鵝血清以 56℃ 經 30 分鐘非動化後，取 50 μL 血清以細胞培養液 MEM 進行 2 倍連續稀釋，與等量之 100 TCID₅₀ GPV 混合，於 37℃ 感作 1 小時後，加入 50 μL 之 3×10^5 /mL 初代正番鴨胚纖維母細胞進行共同培養，於 37℃ 培養 6 ~ 7 天以觀察細胞病理效應（Cytopathic Effect；CPE），並記錄血清鵝源小病毒中和力價。

PCR：引子包括針對水禽小病毒外殼蛋白 VP1 序列設計具水禽小病毒專一性



之引子與根據鵝源小病毒疫苗株與野外株之反向末端重複 (Inverted Terminal Repeats) 核酸序列而設計之區別鵝源小病毒疫苗株與野外株之引子。肛門拭子或雛鵝臟器乳劑以 MagNa Pure 機器 (Roche) 進行核酸萃取，所得核酸作為 PCR 之模板，PCR 試驗反應液為每 50 μL 之 PCR 反應液中含有 39 μL 二次蒸餾水、5 μL 10 倍 PCR 緩衝液、引子 2 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、1 μL 2.5 mM dNTP Mix (Biotool, Spain)、1 μL DNA polymerase (0.25 U/ μL Taq DNA Polymerase, Bertec, Taiwan)、2 μL 待測核酸模板。將上述配製好之反應液放入熱循環反應器中進行反應，反應條件為 94°C 3 分鐘，35 個循環做 94°C 50 秒、50°C 30 秒、72°C 50 秒，再做 72°C 7 分鐘。取 8 μL 之 PCR 產物以 2% 含 EtBr 之瓊膠進行電泳，之後於 UV 燈下觀察產物片段大小。核酸產物經序列分析以進行確認。

結果與討論

鵝隻死亡情形與鵝小病毒中和抗體之結果如表 1。第 1 組 (疫苗免疫與攻毒組) 於攻毒後第 4 天開始出現死亡，共死亡 5 隻 (5/8=62.8%) 鵝隻；第 3 組 (攻毒組) 於攻毒後第 6 天開始出現死亡，共死亡 4 隻 (4/7=57.1%) 鵝隻。第 1 組與第 3 組雛鵝於 2 日齡時之小病毒抗體力價分布於 <2 ~ 1,024 倍，5 日齡攻毒前之抗體力價分布於 <2 ~ 512 倍，攻毒後存活之鵝隻於攻毒前之抗體力價分布於 4 ~ 512 倍，有一鵝隻於攻毒前為 4 倍抗體力價且可耐過小病毒之攻毒，惟於田間水禽飼養場因野外環境複雜，推測雛鵝需有較高之抗體力價始能耐過小病毒之感染。水禽小病毒疫苗國家檢驗標準是注射後需有 32 倍中和抗體力價始為合格 (動物用藥品檢驗標準)。第 2 組與第 4 組雛鵝於 2 日齡時之小病毒抗體力價分布於 <2 ~ 256 倍，19 日齡犧牲前之抗體力價分布於 <2 ~ 1,024 倍，部分鵝隻抗體力價明顯升高，推測有感染現象，雖然試驗中所有鵝隻飼養於同一動物舍，但為分組分籠高架飼養，顯示水禽小病毒具有高度之傳染力。

以 PCR 檢測肛拭與臟器之鵝小病毒核酸之結果見表 1，所有小病毒核酸陽性檢體再進行一次，目的為區分野外毒或疫苗毒核酸之 PCR，結果顯示 PCR

陽性訊號皆為野外毒核酸，如圖 1。有攻毒鵝隻（第 1 組與第 3 組）於攻毒後第 2 天即可於肛拭檢測到病毒核酸，惟第 1 組（疫苗免疫與攻毒組）有 50%（4/8）鵝隻於攻毒後第 2 天可於肛拭檢測到病毒核酸，而第 3 組（攻毒組）僅有 14.3%（1/7）鵝隻於攻毒後第 2 天可於肛拭檢測到病毒核酸，此兩組鵝隻於攻毒後 14 天皆可於肛拭檢測到病毒核酸，顯示雛鵝感染鵝源小病毒後 14 天仍可由糞便排毒。第 2 組鵝隻於攻毒組攻毒後 4 天即可於 1 隻雛鵝肛拭檢測到病毒核酸，此現象加強上述感染水禽小病毒後 2 天即可於肛拭檢測到病毒核酸且本病具有高度傳染力之推論。

試驗鵝隻與 5 日齡相比之增重情形如表 2，體重之標準差（Standard Deviation；SD）如表 3。第 3 組（攻毒組）之平均體重於試驗過程皆高於第 1 組（疫苗施打與攻毒組），如圖 2，且雛鵝之體重整齊度亦為第 3 組較佳，如表 3，然而，鵝隻之增重仍受飼養密度、餵飼量等因素影響，以 T-test 進行分析，兩組間之增重於統計學上並無差異。第 4 組（無處理組）之平均體重於 15 日齡前高於第 2 組（疫苗免疫組），如圖 3，且雛鵝之體重整齊度亦為第 4 組較佳，如表 3；惟以 T-test 進行分析，兩組間之增重於統計學上並無差異。因此，2 日齡雛鵝施打疫苗組，雖未進行野外毒攻毒，但其增重及整齊度皆較未施打疫苗組差；2 日齡雛鵝施打疫苗且進行攻毒組，其死亡速度與死亡率皆較未施打疫苗組高，且存活之雛鵝增重及整齊度亦較差。

結論

由試驗結果可知，雛鵝於 5 日齡感染水禽小病毒是否造成死亡，與於 2 日齡時是否進行疫苗注射較無相關，為與感染時之移行抗體力價高低較為有關，較高之移行抗體力價可使雛鵝耐過小病毒之感染。無論對雛鵝是否進行攻毒，於 2 日齡雛鵝施打疫苗對雛鵝之增重並無明顯貢獻，然而施打疫苗需耗費相當物力、人力與財力，且疫苗之施打可對雛鵝造成極大緊迫，增加其他病原，例如水禽雷氏桿菌或其他伺機菌的感染而造成發病，因此雛鵝不宜施打水禽小病毒疫苗，應以免疫健康種鴨、鵝，藉由移行抗體保護雛鵝、雛鴨預防水禽小病毒感染。





表 1、鵝隻死亡情形、以 PCR 檢測肛拭之鵝小病毒核酸結果與鵝小病毒中和抗體結果。

編號	死亡情形	以 PCR 檢測肛拭中小病毒核酸							抗體力價		
		2 日齡 (疫苗 免疫前)	5 日齡 (攻毒 前)	7 日齡	9 日齡	12 日 齡	15 日 齡	19 日 齡	2 日 齡 (疫 苗免 疫前)	5 日 齡 (攻 毒前)	19 日 齡 (犧 牲)
1-1	DPI 4	-	-	+	-	ND	ND	ND	<2	<2	ND
1-2	活	-	-	-	+	-	+	+	64	16	256
1-3	DPI 4	-	-	+	ND	ND	ND	ND	<2	<2	ND
1-4	DPI 4	-	-	+	ND	ND	ND	ND	<2	<2	ND
1-5	DPI 7	-	-	-	-	+	ND	ND	16	<2	ND
1-6	DPI 9	-	-	+	+	+	ND	ND	<2	<2	ND
1-7	活	-	-	-	+	+	+	+	1024	512	64
1-8	活	-	-	-	+	+	+	+	128	32	>2048
2-1	活	-	-	-	-	-	+	+	<2	<2	1024
2-2	活	-	-	-	-	-	-	+	<2	<2	512
2-3	活	-	-	-	-	-	+	-	4	<2	64
2-4	活	-	-	-	-	+	-	+	4	<2	256
2-5	活	-	-	-	+	-	+	-	32	16	32
2-6	活	-	-	-	-	+	+	+	<2	<2	128
2-7	活	-	-	-	-	-	+	-	<2	<2	128
2-8	活	-	-	-	-	-	+	-	256	64	<2
3-1	活	-	-	-	+	+	+	-	512	128	64
3-2	DPI 8	-	-	-	+	+	ND	ND	<2	<2	ND
3-3	DPI 8	-	-	-	-	+	ND	ND	<2	<2	ND
3-4	活	-	-	-	+	-	+	+	128	64	256
3-6	DPI 10	-	-	-	+	+	ND	ND	<2	<2	ND
3-7	活	-	-	-	+	-	+	+	128	4	32
3-8	DPI 6	-	-	+	+	ND	ND	ND	<2	<2	ND
4-1	活	-	-	-	-	-	+	+	4	1024	256
4-2	活	-	-	-	-	-	+	+	<2	<2	<2
4-3	活	-	-	-	-	-	-	+	<2	<2	<2
4-4	活	-	-	-	-	-	+	+	<2	<2	32
4-5	活	-	-	-	-	-	-	-	8	4	8
4-6	活	-	-	-	-	-	+	-	<2	<2	128

DPI 4：表示為攻毒後第 4 天
 -：陰性。
 +：陽性。
 ND：鵝隻死亡，無進行試驗。

表 2、雛鵝早期免疫水禽小病毒試驗：試驗鵝隻與 5 日齡相比之增重。

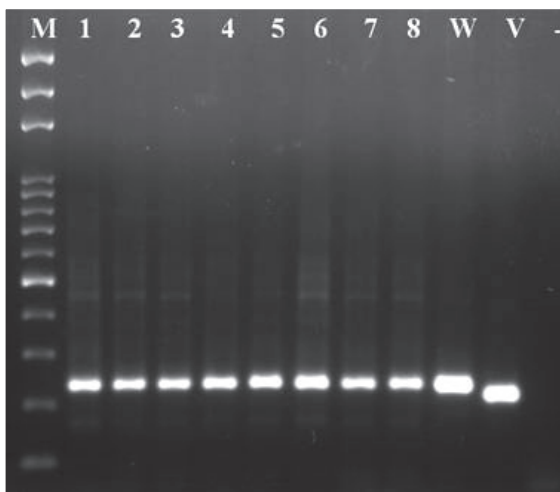
編號	增重 (g)				
	7 日齡	9 日齡	12 日齡	15 日齡	19 日齡
1-1	70	65	ND	ND	ND
1-2	95	210	430	640	1180
1-3	45	ND	ND	ND	ND
1-4	50	ND	ND	ND	ND
1-5	70	70	-10	ND	ND
1-6	70	55	10	ND	ND
1-7	125	245	510	850	1350
1-8	100	210	430	400	425
2-1	110	205	340	490	780
2-2	70	185	320	505	1025
2-3	80	215	365	555	1005
2-4	80	140	250	390	810
2-5	105	225	365	455	760
2-6	80	190	305	390	220
2-7	90	190	320	520	1030
2-8	130	260	400	625	800
3-1	120	295	560	950	1250
3-2	95	100	60	ND	ND
3-3	110	180	120	ND	ND
3-4	140	255	515	855	955
3-6	85	95	40	ND	ND
3-7	125	255	520	850	1150
3-8	80	100	ND	ND	ND
4-1	90	220	330	320	680
4-2	100	215	395	455	720
4-3	95	240	410	640	880
4-4	105	230	395	630	820
4-5	100	220	345	560	1000
4-6	95	220	350	560	690

ND：鵝隻死亡，無進行試驗。



表 3、雛鵝早期免疫水禽小病毒試驗：試驗鵝隻體重之標準差

組別	體重之標準差					
	5 日齡	7 日齡	9 日齡	12 日齡	15 日齡	19 日齡
第 1 組	39.7	63.5	128.3	283.8	250.1	515.0
第 2 組	21.7	37.6	47.3	58.3	90.3	272.0
第 3 組	33.6	54.1	116.8	276.4	57.7	152.8
第 4 組	16.0	12.6	19.7	35.7	114.5	126.5



M：100 bp 核酸標記。
 1～8：檢體。
 W：鵝源小病毒野外毒陽性對照。
 V：疫苗毒陽性對照。
 -：陰性對照。

圖 1、以 PCR 區分野外毒或疫苗毒，結果顯示 PCR 陽性訊號皆為野外毒核酸。



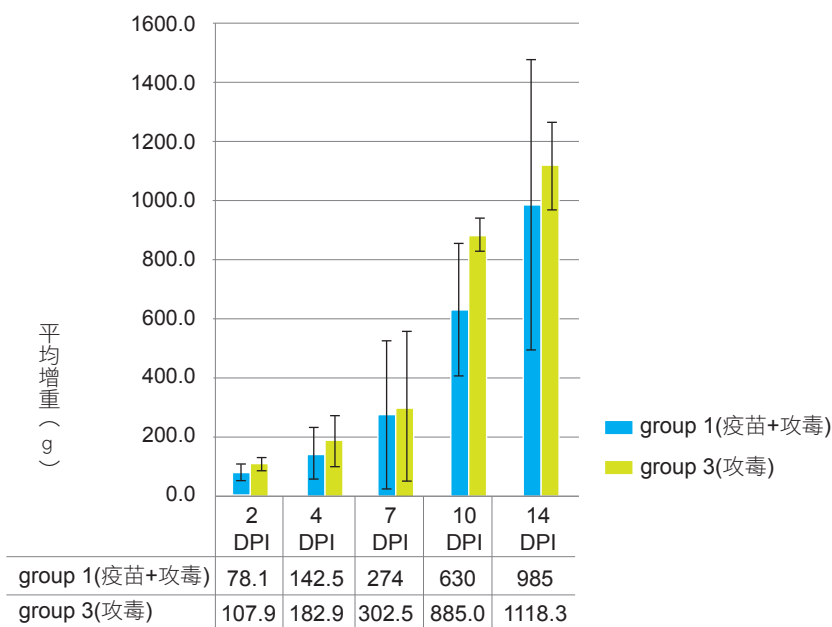


圖 2、雛鵝早期免疫水禽小病毒試驗：第 3 組（攻毒組）之平均體重於試驗過程皆高於第 1 組（疫苗施打與攻毒組），且雛鵝之體重整齊度亦為第 3 組較佳，

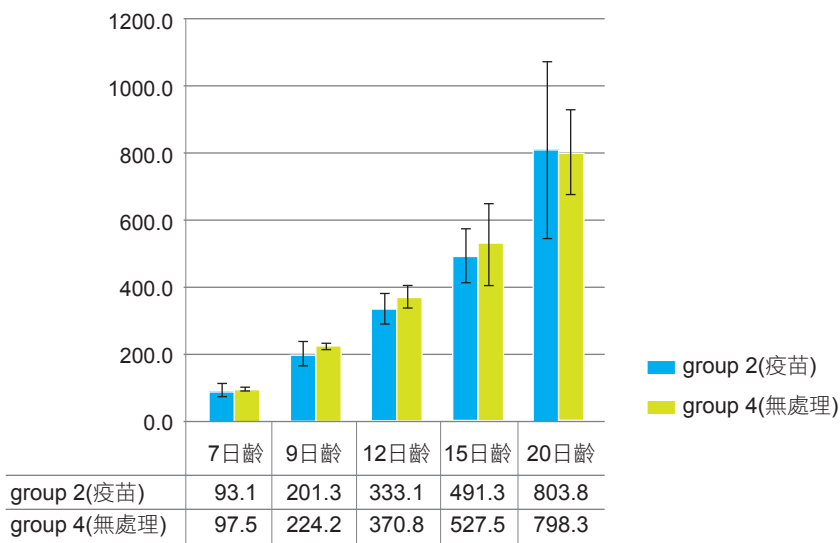


圖 3、雛鵝早期免疫水禽小病毒試驗：第 4 組（無處理組）之平均體重於 15 日齡前高於第 2 組（疫苗免疫組），且雛鵝之體重整齊度亦為第 4 組較佳。



參考資料

1. 呂榮修。禽病診斷彩色圖譜。1995。
2. 張照夫、蔡信雄、尤碧豔。肆虐本省之鵝病毒性腸炎。台灣畜牧獸醫學會會報 42; 37-46, 1983.
3. Gough RE. 2003. Goose parvovirus infection. In: Saif, Y.M. ed. Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, USA. p777-783.
4. Palya V, Zolnai A, Benyeda Z, Kovács E, Kardi V, Mató T. 2009. Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus. Avian Pathol., 38: 175-180.
5. Woolcock PR, Jestine V, Shivaprasad HL. 2000. Evidence of Muscovy duck parvovirus in Muscovy ducklings in California. Vet. Rec., 146: 68-72.

