



抗鴨病毒性肝炎 卵黃抗體製劑田間試驗

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 3 週齡以下之雛鴨，為一急性致死性疾病，以肝炎為主要病變特徵，隨著日齡增加對疾病的耐受性越高。本所研發之抗鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑，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 DHAV-1 強毒感染亦不會影響鴨隻發育。依據動物用藥品技術審議委員會生物藥品組第 164 次委員會議委託國立中興大學進行田間試驗。結果顯示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。

緒言

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，對 3 週齡以下的雛鴨造成高死亡率。DHV 依據血清學方法可區分成 DHV-I、II、III 三型。目前 DHV-II 只發生於英國，DHV-III 只於美國有發生之報告，病原同為星狀病毒科（Astroviridae）。而 DHV-I 分布最廣、病原性最強，為 Picornaviridae 中的 Avihepatovirus 病毒屬之鴨肝炎 A 病毒（Duck Hepatitis A Virus；DHAV）病毒種。DHV-I 的發病率可達 90% 以上，而死亡率則依日齡不同而異，鴨隻品種不同對於 DHV 的敏感性也不同，小於 1 週齡之雛鴨其死亡率可達 95%，隨著日齡增加，發病率

與死亡率則降低。台灣分別於 1972 與 1990 年發生兩次 DHV-I 大流行，而於 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。

鴨病毒性肝炎有活毒減毒疫苗可供種禽免疫，以移行抗體作為雛鴨疾病之預防，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，造成部分幼禽仍有疫情發生；部分嚴重污染場，施打疫苗效果有限，需配合被動免疫才能獲得更好控制。本製劑用於預防鴨病毒性肝炎，不但能提供疾病之預防，亦能提供疾病之治療控制。本製劑已完成研發，依據動物用藥品技術審議委員會生物藥品組第 164 次委員會議，委託國立中興大學分別於雲林縣及嘉義縣進行田間試驗，結果顯示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。

材料方法

- 一、卵黃抗體製劑樣品：抗第一血清型鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑 20,000 劑量。
- 二、攻毒用 DHAV-1 強毒株：2008 年雲林縣野外分離株（DHAV-1 08D）。
- 三、卵黃抗體製劑安全試驗：逢機選取 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 0.5mL（1 劑量），第 2 組 10 隻，每隻各肌肉注射本劑 1mL（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。
- 四、卵黃抗體製劑效力試驗：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，每組鴨隻均以 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。前項試驗結果未能達標準者得予複驗之。

五、田間試驗：選定田間試驗配合場 2 場，鴨群為 3,000-10,000 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。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 μm 濾膜過濾，再將濾液接種（0.2mL/ 胚）於 5 個 7-8 日齡 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 隻為不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（1,000 LD₅₀/ 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。

試驗結果

卵黃抗體製劑樣品：

1. 特性試驗：為乳黃清澈液體，無異物及異常氣味（圖 1）。
2. 卵黃抗體力價：血清中和（Serum Neutralization; SN）力價大於 1,000 倍。
3. 無菌試驗：
 - (1) TGC（Thioglycollate）培養基置於 37℃ 培養觀察 14 日。觀察期間並無菌發育。再行玻片塗抹以 Giemsa 染色油鏡觀察無可見之細菌。
 - (2) Sabouraud 培養基置於 22-24℃ 培養 10 日。觀察期間並無菌發育。再取 2 支新培養基取上述經 10 培養液各 1mL 再於 22-24℃ 培養 7 日，並無真菌生長。



4. REV 病毒迷入試驗：行 RT-PCR 反應，結果無產物出現，本產品沒有 REV 之污染。
5. 安全試驗：注射後觀察 10 天，均無不良反應健存，各組鴨隻體重大小均無顯著性差異。
6. 效力試驗：選取 1 日齡番鴨（嘉義縣牧場購得），於本劑注射後 24 小時以 DHAV-1 野外分離株 1,000 LD₅₀ 肌肉注射攻擊，連續觀察 10 天。結果本劑注射組全數健存，對照組有 60% 健存（6/10）。另從宜蘭畜試所購得 1 日齡番鴨，注射後 24 小時，所有鴨隻每隻以 DHAV-1 野外分離株 1,000 LD₅₀ 肌肉注射攻擊，之後連續觀察 10 天。結果本劑注射組 9/10（90%）健存，對照組死亡率 100%。

田間試驗：

委託國立中興大學分別於嘉義縣番鴨場及雲林縣土番鴨場各進行 1 場田間試驗。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 1 劑量，200 隻為無注射對照，注射前血清中和指數（Neutralization Index；NI）值 < 1.5，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 日齡對照組之死亡率未達 80%（表 1）。鴨群於 2 週齡時有異常死亡，經剖檢確診為雷氏桿菌症，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%。

嘉義縣番鴨場番鴨 3,800 隻於 1 日齡及 10 日齡分別注射本劑一劑量，200 隻為無注射對照組。免疫前採血測 DHAV-1 抗體 NI 值 > 1.5（平均值 1.89）為 45%（9/20）；NI 值 < 1.5（平均值 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 日齡對照組之死亡率未達 80%（表 2）。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%。



結論

種鴨場長期以來為避免因注射 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 活毒減毒疫苗免疫效果而造成疫苗成效不彰。故採卵黃抗體被動免疫雛鴨來進行鴨病毒性肝炎之預防。雛鴨感染鴨病毒性肝炎後一般於 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。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。

本所開發抗鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑，已經完成實驗室試驗，建議抗體製劑 SN 抗體力價大於 1,000 倍以上，於 1 日齡及 10 日齡注射 1 劑量，可以保護雛鴨耐過 DHAV-1 強毒感染。完成之試驗資料已送審，依據動物用藥品技術審議委員會生物藥品組第 164 次委員會議決議，委託國立中興大學進行田間試驗。於雲林縣和嘉義縣各進行 1 鴨場之田間試驗。本次試驗所用之抗鴨病毒性肝炎卵黃抗體 200,000 劑，經實驗室檢驗，SN 抗體力價大於 1,000 倍，安全以及效力試驗皆合格。田間試驗則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。雲林縣土番鴨 2、7、14 日齡帶回以 DHAV-1 強毒株攻毒，免疫組皆無死亡與臨床病變，然而 7、14 日齡對照組死亡率未達 80%，推測可能部分鴨隻仍有抗體，亦隨日齡增加對 DHAV-1 耐性增加。試驗過程因為該鴨場有雷氏桿菌症發生，造成異常死亡，剖檢死亡之鴨隻未發現有任何鴨病毒性肝炎病變。結果顯示本製劑在田間使用具安全性及良好之效率。嘉義縣番鴨場抽驗 20 隻 1 日齡雛鴨，45% 血清 NI 值大於 1.5，以致於 2 日齡攻毒時對照組死亡率沒有達到 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。因為現場鴨隻來源不同、飼養環境以及飼養方式不同，而使得田間試驗的變數增多，然而此兩場鴨場之田間試驗結果顯示本製劑仍具有高度之安全性，以及有良好的保護效力可以保護雛鴨耐過易感染 DHAV-1 時期。未來此成果將可提供水禽產業被動免疫的需求，有效預防及治療鴨病毒性肝炎。

致謝

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



圖 1、抗第一血清型鴨病毒性肝炎卵黃抗體製劑。

表 1、田間試驗土番鴨場 DHAV-1 攻毒結果。(%)

組別		日齡		
		2	7	14
免疫組	存活率	100	100	100
	死亡率	0	0	0
對照組	存活率	10	40	70
	死亡率	90	60	30

表 2、田間試驗番鴨場 DHAV-1 攻毒結果。(%)

組別		日齡		
		2	7	14
免疫組	存活率	100	100	100
	死亡率	0	0	0
對照組	存活率	60	60	70
	死亡率	40	40	30