

水禽雷氏桿菌症三價不活化菌苗之效力試驗

報告人：喻昭芳 助理研究員（製劑研究組）

壹、緒言

由 *Riemerella anatipestifer*(RA)引起的水禽雷氏桿菌症為台灣重要的水禽傳染性疾病，鴨和鵝在 1~8 週齡對本病最具感受性，主要引起病禽敗血症、全身性漿膜炎、恢復禽隻生長遲緩及不合格屠體增加，不良的飼養環境及其他疾病併發皆會造成本病的爆發，發病率可由 5%~75%，發病場常一再發病，且清除不易而重複發生，造成業者經濟損失，故發展有效菌苗防疫為一必然趨勢。

本菌的血清型別複雜，目前共有 21 種血清型，除了第 5 與第 2、9 型間具微弱交叉反應外，其餘之間皆無交叉保護力，而造成預防上的困難。最理想的方式是突破血清型別的限制，找出可產生保護力之致病或毒力因子來開發菌苗防疫，但目前仍未有成果，所以現階段施打有效的多血清型多價菌苗，應是最佳的防治方式與暫時解決的方法。

本次研究為試製第 1、2 與 6 血清型三價不活化菌苗，於 97 年 2~3 月間先進行實驗室評估，4~7 月間再應用於田間水禽場，之後部份動物帶回本所攻毒，最後得到菌苗保護效力成績。

貳、材料與方法

由中央畜產會調查提供，截至 94 年止的台灣分離 RA 菌株中，流行血清型別依序為第 2、6 與第 1 和 10，因此選定第 1、2 與 6 血清型研製與製備三價菌苗。於第 1 及 2 週齡時在實驗室免疫北京鴨與白羅曼鵝，而在 4 週齡時使用 3 種血清型菌株各分 3 階段濃度菌液每階段 5 隻動物分別注射攻毒免疫組及對照組，攻擊後觀察 2 週內兩組的死亡結果，以 Beherens-Karber 法計算兩組 LD₅₀ 防禦指數（兩組 LD₅₀ 之對數差），由此防禦指數評估本菌苗的效力。之後應用於雲林縣和嘉義縣轄內水禽場，免疫注射各 1,500 隻北京鴨與番鴨，及 2,000 隻白羅曼鵝，屆齡時攜回所裡攻毒，同上說明方法計算其 LD₅₀ 防禦指數，最終獲得三價菌苗對田間水禽場鴨和鵝隻的效力試驗成績。

參、結果與討論

本次研究結果顯示，在實驗室方面菌苗的效力試驗成績，北京鴨於免疫三價菌苗後分別攻擊 3 種血清型菌株後的 LD₅₀ 防禦指數為 $10^{>1.16}$ (RA1)、 $10^{>0.5}$ (RA2)與 $10^{>0.5}$ (RA6)[詳見表 1]，而在鵝為 $10^{>1.39}$ (RA1)、 $10^{>0.37}$ (RA2)及 $10^{>1.0}$ (RA6)[詳見表 2]。另外田間試驗部份，對北京鴨與番鴨

的 LD₅₀ 防禦指數為 $10^{0.84}$ (RA1)、 $10^{>0.83}$ (RA2) 與 $10^{>1.25}$ (RA6); $10^{>0.43}$ (RA1)、 $10^{0.83}$ (RA2) 和 $10^{>0.33}$ (RA6) [詳見表 3 和表 4]; 對鵝則是 $10^{1.47}$ (RA6) [詳見表 5]。

菌苗效力的評估方面，目前仍使用攻毒後計算免疫及對照組 LD₅₀ 獲得防禦指數的方式，根據之前動物實驗的經驗得知，不同場別甚至不同批次的動物，對 RA 菌的 LD₅₀ 致死濃度常會改變，田間試驗場在鵝的效力結果，攻擊第 1 和 2 血清型菌株時則發生免疫與對照組均不死亡的情形，導致最終無法得到效力成績，為改善此一現象，在未來的實驗中，可由 3 階段改為 5 階段濃度菌液攻毒，或是隔 1 階段(次方)濃度擴大濃度範圍方式進行。

在上述 LD₅₀ 防禦指數中，部份出現大於多少次方的數據，其原因為攻毒後免疫組有時動物死亡隻數不到一半，或是對照組死亡超過一半，因而無法算出其 LD₅₀ 濃度，就以攻擊時菌液最高(免疫組)或最低濃度(對照組)作為其 LD₅₀ 濃度，所以實際菌苗的效力成績是大於此次方數據的效力成績。

本次試驗中絕大多數效力成績已達不活化菌苗的國家動物用藥品檢定標準(如：*E.coli* $\geq 10^{0.5}$)，顯示免疫本菌苗後經人工感染可產生良好的保護效果。

表一、北京鴨免疫水禽雷氏桿菌症三價菌苗效力試驗結果

Groups	No. of Ducklings for Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions from 3 Homologous Serotypes Strains			LD ₅₀ Portection Index
		1 0 0 × Condensed	1 0 × Condensed	Original	
<u>Challenge with Serotype 1</u>					
Immunized	13	25(1/4)	60(3/5)	75(3/4)	LD ₅₀ = 1.1×10 ^{11.16}
Control	12	0(0/4)	0(0/4)	0(0/4)	LD ₅₀ <1.1×10 ^{10.0} PI>10 ^{1.16} >14.45x
		20 × Condensed	1 0 × Condensed	Original	
<u>Challenge with Serotype 2</u>					
Immunized	14	60(3/5)	80(4/5)	100(4/4)	LD ₅₀ = 8×10 ^{10.0}
Control	12	0(0/4)	0(0/4)	100(4/4)	LD ₅₀ = 4×10 ^{9.5} PI>100.5>3.16x
		300 × Condensed	30 × Condensed	3 × Condensed	
<u>Challenge with Serotype 6</u>					
Immunized	13	75(3/4)	100(5/5)	100(4/4)	LD ₅₀ >3.6×10 ^{10.0}
Control	11	50(2/4)	50(2/4)	100(3/3)	LD ₅₀ = 3.6×10 ^{9.5} PI>100.5>3.16x

表二、白羅曼鵝免疫水禽雷氏桿菌症三價菌苗效力試驗結果

Groups	No. of Goslings f or Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions from 3 Homologous Serotypes Strains			LD50 Portection Index
		1 O ³ × Diluted	1 O ⁴ × Diluted	1 O ⁵ × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 1</u>					
Immunized	13	100(4/4)	100(5/5)	75(3/4)	LD50>2.2×107.0
Control	13	25(1/4)	20(1/5)	75(3/4)	LD50 = 2.2×105.61 PI>101.39>24.55x
		1 O9 × Diluted	1 O1 O × Diluted		
<u>Challenge with Serotype 2</u>					
Immunized	8	100(4/4)	100(4/4)		LD50>1.2×101.0
Control	10	20(1/5)	100(5/5)		LD50= 1.2×100.63 PI>100.37>2.34x
		Original	1 O × Diluted	1 O O × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 6</u>					
Immunized	13	0(0/4)	60(3/5)	75(3/4)	LD50 = 6.8×108.0
Control	13	0(0/4)	0(0/5)	0(0/4)	LD50<6.8×107.0 PI>101.0>10x

表三、田間水禽鴨場北京鴨免疫水禽雷氏桿菌症三價菌苗效力試驗結果

Groups	No. of Ducklings for Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions from 3 Homologous Serotypes Strains			LD50 Portection Index
		20 × Condensed	2 × Condensed	5 × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 1</u>					
Immunized	15	20(1/5)	40(2/5)	80(4/5)	LD ₅₀ = 6.8×10 ^{9.84}
Control	15	0(0/5)	20(1/5)	40(2/5)	LD ₅₀ = 6.8×10 ^{9.0} PI = 10 ^{0.84} = 6.92x
		30 × Condensed	10 × Condensed	Original	
<u>Challenge with Serotype 2</u>					
Immunized	15	80(4/5)	80(4/5)	100(5/5)	LD ₅₀ > 9×10 ^{10.0}
Control	15	0(0/5)	0(0/5)	60(3/5)	LD ₅₀ = 3×10 ^{9.17} PI > 10 ^{0.83} > 6.76x
		400 × Condensed	40 × Condensed	4 × Condensed	
<u>Challenge with Serotype 6</u>					
Immunized	15	20(1/5)	80(4/5)	60(3/5)	LD50 = 2.4×10 ^{11.25}
Control	15	0(0/5)	20(1/5)	20(1/5)	LD50 < 2.4×10 ^{10.0} PI > 10 ^{1.25} > 17.78x

表四、田間水禽場番鴨免疫水禽雷氏桿菌症三價菌苗效力試驗結果

Groups	No. of Ducklings for Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions from 3 Homologous Serotypes Strains			LD ₅₀ Portection Index
		2 × Condensed	5 × Diluted	50 × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 1</u>					
Immunized	15	100(5/5)	60(3/5)	100(5/5)	LD ₅₀ >4×10 ^{10.0}
Control	15	60(3/5)	60(3/5)	75(1/4)	LD ₅₀ = 4×10 ^{9.57} PI>10 ^{0.43} >2.69x
		5 × Diluted	50 × Diluted	500 × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 2</u>					
Immunized	15	100(5/5)	100(5/5)	100(5/5)	LD ₅₀ >2.2×10 ^{9.0}
Control	13	0(0/5)	75(3/4)	75(3/4)	LD ₅₀ = 2.2×10 ^{8.17} PI>100.83>6.76x
		100 × Condensed	50 × Condensed	10 × Condensed	
<u>Challenge with Serotype 6</u>					
Immunized	13	100(4/4)	100(4/4)	80(4/5)	LD ₅₀ >6.5×10 ^{11.0}
Control	14	40(2/5)	60(3/5)	75(3/4)	LD ₅₀ = 6.5×10 ^{10.67} PI>100.33>2.14x

表五、田間水禽場白羅曼鵝免疫水禽雷氏桿菌症三價菌苗效力試驗結果

Groups	No. of Goslings for Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions from 3 Homologous Serotypes Strains			LD ₅₀ Portection Index
		1 0 × Diluted	1 0 0 × Diluted	1 0 0 0 × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 1</u>					
Immunized	15	100(5/5)	100(5/5)	80(4/5)	LD ₅₀ =
Control	15	80(4/5)	80(4/5)	100(5/5)	LD ₅₀ = PI=
		1 0 7 Diluted	1 0 8 Diluted	1 0 9 Diluted	
<u>Challenge with Serotype 2</u>					
Immunized	15	100(5/5)	100(5/5)	100(5/5)	LD ₅₀ =
Control	15	100(5/5)	80(4/5)	80(4/5)	LD ₅₀ = PI=
		Original	1 0 × Diluted	1 0 0 × Diluted	
<u>Challenge with Serotype 6</u>					
Immunized	15	40(2/5)	100(5/5)	75(3/4)	LD ₅₀ = 6.1×10 ^{8.69}
Control	14	0(0/5)	40(2/5)	40(2/5)	LD ₅₀ = 6.1×10 ^{7.22} PI= 101.47= 29.51×