

抗水禽雷氏桿菌症雙價卵黃抗體中和保護效力之研究

喻昭芳*、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 預防水禽雷氏桿菌症 (RA) 主動免疫方面的研究已獲得一定的成果，但被動免疫方面則少見。視水禽場流行本病的血清型給予該型別卵黃抗體，使雞鴨 (鵝) 被動保護耐過易罹病週齡，達到緊急預防與治療作用，提供水禽產業防疫本病另一項選擇。高度免疫蛋雞、蛋鴨後製備抗第 1、2 型雙價雞源、鴨源卵黃抗體製劑，其安全性與中和保護效力測試完成後，進一步進行效力維持期、交叉保護、事後治療與不同週齡效力等試驗。結果顯示抗第 1、2 型雙價卵黃抗體製劑對北京鴨、番鴨和白羅曼鵝安全性無虞，且具被動免疫保護效果 (先免疫後攻毒)。雙價雞源或鴨源卵黃抗體製劑 (ELISA sample/negative 比：雞源 3.39~5.78；鴨源 16.22~20.57) 對三種目標鴨鵝，可提供兩種血清型感染的保護至第 5~10 天，且於鴨隻 2~5 週齡時給予皆具有足夠預防效果。此外，鴨隻被動免疫雙價卵黃抗體後，若攻毒菌量為 10^7 CFU/mL 時亦具有治療效果 (先攻毒後免疫)。然而，雙價卵黃抗體對其他血清型感染則缺乏被動交叉保護效果。另評估單劑量成本、產蛋動物乾淨度以及效力試驗穩定性等因素，未來將以蛋雞系統量產製造抗本病卵黃抗體製劑。本次研究結果顯示，此雙價卵黃抗體製劑研發完成商品化後，將可提供水禽產業對抗相同血清型 RA 感染之被動免疫保護力。

關鍵字：水禽雷氏桿菌症、卵黃抗體、效力、治療、交叉保護。

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 (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[5,9]。

本病的主動免疫方面，世界各地學者已研製和開發各種菌苗，並已取得一定的效果[6,12,14]，但在被動免疫的研究則比較少見。對於家禽給予特定血清型抗原高度免疫刺激後，誘發產生特異性抗體積存於其卵黃中，並經抽取與純化，再視不同區域水禽場所流行的特殊血清型而給予卵黃抗體進行被動保護，如

此不但可讓動物在極短期內獲有保護力，達到緊急的預防與治療效果，在防衛時程上顯然比施打死菌疫苗時至少需等待 2 週以上才可獲得保護力之辦法為優，如此在田間水禽場之 RA 防治上亦是另一種防疫選擇。此外，以卵黃作為特異性抗體的生產成本較低廉，又無需進行動物大量採血或犧牲，且禽卵的卵黃中僅存有一種抗體 (Immunoglobulin yolk; IgY)，其分離手續簡單，又可有高量採收成果，不似哺乳動物血清中含有多種抗體，且各種抗體不易予以分離[8]。

本實驗室已完成以台灣較高流行率的第 2 血清型 RA 菌苗高度免疫中幼齡 SPF 蛋雞與蛋鴨，收集其全部蛋黃液以水稀釋等方法萃取調製成卵黃抗體製劑，並完成該製劑對雛鴨 (鵝) 之安全與效力等測試。

本研究再使用蛋雞和蛋鴨系統生產抗第 1 型和第 2 型 RA 菌雙價卵黃抗體製劑，繼續進行各項動物測

試，以因應水禽市場之防疫需求，減少水禽產業因本病造成的損失。

材料與方法

抗第 2 血清型 RA 單價與抗第 1、2 血清型 RA 雙價雞（鴨）源卵黃抗體製劑之製備

以第 2 型 RA 或第 1、2 型 RA 不活化菌苗分別高度免疫蛋雞和蛋鴨後每日取蛋，之後使用水稀釋法、高速離心與硫酸鈉沉澱法分離萃取出抗 RA 卵黃抗體製劑（方法詳見本所第 47 期研究報告）[7]，並置放於 4°C 冰箱保存備用。高免用之蛋雞（SPF 雞）購自本所動物用藥品檢定分所，蛋鴨（改鴨）則自宜蘭縣一間水禽場購買，之後飼養至開始產蛋後再進行多次高度免疫，並於每月持續採血檢測與監控血清與卵黃抗體製劑之 ELISA 與試管凝集抗體力價（方法與結果詳見本所第 47 期研究報告）。

抗第 1、2 血清型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之安全與效力測試（先免疫後攻毒）

試驗鴨（鵝）於 10~14 日齡時採血檢測 RA 第 1、2 血清型 ELISA 抗體，體內移行抗體消退後始作為後續試驗動物。10~14 日齡健康鴨（鵝）10 隻分兩組，分別注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量與 2 劑量，持續 2 週觀察鴨（鵝）有無出現不良反應，此為本抗體製劑之安全性測試。10~14 日齡健康鴨（鵝）9~12 隻肌肉注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量，隔日與未注射對照組 9~12 隻鴨（鵝）一起攻毒 3~4 階濃度第 1 或第 2 型 RA 菌液，攻擊後觀察 2 週並記錄死亡情形，最後計算出免疫組存活率與對照組死亡率。目前國內尚無抗本病卵黃抗體製劑之國家檢定標準，因此先參考本病不活化菌苗檢驗標準（免疫組存活率 $\geq 80\%$ 且對照組死亡率 $\geq 80\%$ ）進行評估[1]。本研究所有試驗用鴨、鵝分別購自畜產試驗所宜蘭分所及彰化種畜繁殖場，1 日齡購入本所後，飼養至所需日齡後再進行各項動物試驗。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力維持期測試（先免疫後攻毒）

10~14 日齡健康鴨（鵝）27~36 隻肌肉注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量，注射當日為第 1 日，接種後於第 5、8、10 日（有些組別排程因週休等因素，順應調整為第 4、第 7 或第 9 日進行）與未給予抗體對照組分別攻毒 3~4 階濃度第 1 或第 2 型 RA 菌液，攻毒後同樣觀察 2 週與記錄死亡情形，計算出免疫組存活率與對照組死亡率。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑對鴨隻之治療效果測試（先攻毒後免疫）

10~14 日齡健康鴨隻 48 隻先以 4 階濃度第 2 型 RA 菌液攻毒，攻毒當日為第 1 日，其中兩組鴨隻於第 2 或第 3 日分別肌肉注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量予以治療，之後觀察 2 週並記錄死亡情形，計算出免疫組存活率與對照組死亡率。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨隻後對不同血清型 RA 之交叉保護測試

10~14 日齡健康鴨隻 12 隻肌肉注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量，接種後隔日與未給予抗體對照組攻毒 4 階濃度第 6 型或第 11 型 RA 菌液，同樣觀察 2 週與記錄死亡情形，最後計算出免疫組存活率與對照組死亡率。

不同週齡鴨隻被動免疫抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑之效力測試

每組 12 隻共 4 組健康鴨隻分別於 2、3、4、5 週齡時分別肌肉注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量，接種後隔日與未給予抗體對照組攻毒 4 階濃度第 2 型 RA 菌液，攻毒後觀察 2 週並記錄死亡情形，最後分別計算出 4 組之免疫組存活率與對照組死亡率。

抗第 1、2 型 RA 雙價鴨源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力測試

材料與方法與上述「抗第 1、2 血清型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力測試（先免疫後攻毒）」相同，唯改以接種注射鴨源卵黃抗體製

劑 1 劑量進行測試。

抗第 1、2 型 RA 雙價鴨源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力維持期測試

材料與方法與上述「抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力維持期測試（先免疫後攻毒）」相同，唯改以接種鴨源卵黃抗體製劑 1 劑量進行測試，鴨隻於注射後第 5、7、9 日，而鵝隻為第 3、5、8、10 日分別攻毒 3~4 階濃度第 2 型 RA 菌液，而維持期攻毒日程之安排因週休等因素，調整為第 4、7、9 日或 5、8、10 日進行。

結果

抗第 1、2 血清型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之安全與效力測試（先免疫後攻毒）

供安全試驗用之北京鴨、番鴨與白羅曼鵝注射雞源卵黃抗體製劑 1 劑量或 2 劑量後，結果顯示所有鴨鵝均無出現不適且健康存活。三種鴨鵝接種雞源卵黃抗體製劑後攻毒第 1 或第 2 型 RA 菌，結果顯示試製之雙價卵黃抗體在鴨（鵝）體內對兩種血清型 RA 菌之攻毒，皆具足夠被動免疫保護效果（詳如表 1）。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力維持期測試（先免疫後攻毒）

三種鴨鵝 2 週齡注射雞源卵黃抗體製劑後於第 3、5、8、10 日攻毒第 1 或第 2 型 RA 菌，結果顯示北京鴨對第 1 型 RA 菌被動免疫保護效力可至第 10 日，對第 2 型 RA 菌可提供保護至第 9 日；番鴨給予卵黃抗體後對第 1、2 型 RA 菌攻毒可保護至第 10 日；而對白羅曼鵝亦可保護至第 10 日（第 1 型）與 5 日（第 2 型），結果詳見表 2~4。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑對鴨隻之治療效果測試（先攻毒後免疫）

2 週齡北京鴨先攻毒第 2 型 RA 菌後於第 2 或第 3 天分別給予雞源卵黃抗體製劑予以治療，結果顯示攻毒菌量如等於 10^7 CFU/mL 時，鴨隻可被治療痊癒且耐過攻毒而健康存活；而攻毒菌量大於 10^7

CFU/mL 時則缺乏保護效果（詳如表 5）。

抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑被動免疫鴨隻後對不同血清型 RA 之交叉保護測試

2 週齡鴨隻注射雞源卵黃抗體製劑後隔日攻毒第 6 型或第 11 型 RA 菌，結果顯示在番鴨對第 6 型 RA 菌攻毒缺乏交叉保護；而北京鴨對第 11 型 RA 菌攻毒亦無法耐過存活（詳如表 6）。

不同週齡鴨隻被動免疫抗第 1、2 型 RA 雙價雞源卵黃抗體製劑之效力測試

2、3、4、5 週齡北京鴨分別注射雞源卵黃抗體製劑後隔日攻毒第 2 型 RA 菌，結果顯示卵黃抗體對 2~5 週齡鴨隻皆具被動保護效果（詳如表 7）。

抗第 1、2 型 RA 雙價鴨源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力測試

北京鴨與白羅曼鵝接種鴨源卵黃抗體製劑後隔日攻毒第 1 型或第 2 型 RA 菌，結果顯示雙價卵黃抗體對鴨隻可提供兩種血清型 RA 菌攻毒的保護，而鵝隻對第 2 型 RA 菌亦具有被動免疫保護效果（詳如表 8）。

抗第 1、2 型 RA 雙價鴨源卵黃抗體製劑被動免疫鴨（鵝）之效力維持期測試

2 週齡鴨（鵝）注射鴨源卵黃抗體製劑後於不同時間攻毒第 2 型 RA 菌，結果顯示北京鴨對第 2 型 RA 菌被動免疫保護效力可至第 7 日；而白羅曼鵝亦可保護至第 8 日，結果詳見表 9、10。

討論

本研究首先選擇目前在台灣分離率高且病害性亦高的第 2 血清型 RA 菌作為抗原，高度免疫蛋雞與蛋鴨後製備第 2 型卵黃抗體製劑，且已先後完成第 2 型包括安全、效力與最低有效劑量等動物試驗[7]。由 2005 年至 2012 年鴨（鵝）分離株血清學鑑定結果顯示，除了分離率一直名列前茅的第 2 血清型外，第 1 型亦佔有一定比例[3,4]。因此本研究併入次流行的第 1 型 RA 菌，製備雙價菌苗高度免疫蛋雞與蛋鴨，並製備雙價卵黃抗體製劑進行對鴨（鵝）之各項

測試。

對三種目標鴨鵝之安全與效力測試結果顯示，試製之雞源和鴨源雙價卵黃抗體對北京鴨、番鴨與白羅曼鵝之安全性無虞。由接種卵黃抗體製劑後攻毒之效力試驗結果顯示，第 1、2 型雞源雙價卵黃抗體對同型 RA 菌的攻毒，在三種鴨鵝皆具足夠被動免疫保護效果，惟鴨源卵黃抗體之效力成績時好時壞並不穩定。蛋雞鴨鵝的免疫球蛋白 IgY 是由血清轉移至卵黃中，雞僅有完整型 IgY 分子[8]，而鴨和鵝除完整型 IgY 外，另有缺失型 IgY (Δ Fc)。推測此為造成本研究製備之單價或雙價鴨源卵黃抗體製劑對雞鴨（鵝）被動免疫保護效力不一的原因之一，可能為蛋鴨血清與卵黃抗體之 ELISA 數值雖高，但 ELISA 並無法區別 IgY 與 IgY (Δ Fc) (據文獻記載其比例約為 1:3~9)[2,10]，而完整型 IgY 於動物染病時具有中和外界抗原或毒素作用，使動物短期內即可獲得被動免疫保護，但缺失型 IgY (Δ Fc) 是否亦具有同樣中和抗原能力尚不明瞭。

在雙價雞源卵黃抗體製劑之效力維持期測試方面，結果顯示在北京鴨對第 1、2 型 RA 菌被動免疫保護效力可至第 10 日（1 型）與第 9 日（2 型）；在番鴨則兩種血清型均可保護至第 10 日；於白羅曼鵝亦可分別保護至第 10 日（1 型）與第 5 日（2 型）。本病第 1、2 型雙價卵黃抗體在三種鴨鵝的效力成績與保護維持期分析，第 1 型的保護效果似乎優於第 2 型，推測可能為第 1 型菌苗株對蛋雞的免疫原性較佳，之後產生的卵黃抗體力價相對較高，注射的 1 劑量卵黃抗體製劑中 1 型力價也較高，所以被動免疫雞鴨（鵝）的效力維持較久。此外，鴨、鵝不同物種先天體型大小的差異，對卵黃抗體注射後於體內代謝時間的快慢，似乎亦會對效力維持期的長短造成影響。例如相同週齡北京鴨與白羅曼鵝的平均體重，於 2 週齡時會有約 200g 的差異（鴨：483 g；鵝：690g）。第 1 型抗體力價夠高，所以鴨鵝體型差異的因素顯現不出影響，但第 2 型力價相較不足，此不同體型對鵝隻抗體維持期則短至第 5 日。

至於雙價鴨源卵黃抗體製劑之效力維持期測試方面，結果顯示在北京鴨和白羅曼鵝對第 2 型 RA 菌之

被動免疫效力可分別至第 7 日和第 8 日。本部份僅完成對第 2 型 RA 菌之測試，因之後已決定採用蛋雞生產系統量產卵黃抗體，所以並無繼續對第 1 型進行測試。

鴨隻先攻毒 RA 菌後再給予雞源卵黃抗體治療之結果顯示，攻毒的第 2 型 RA 菌量若為 10^7 CFU/mL 且於第 2 或第 3 天及時給予治療時，鴨隻可耐過攻毒且被治療痊癒，但菌量大於 10^7 CFU/mL 時則缺乏保護效果。推測可能 1 劑量卵黃抗體製劑的抗體力價，剛好可被 10^7 CFU 菌數中和，因此超過此中和量時則無法提供治療效果。

無論使用活毒或死毒菌苗免疫鴨（鵝）後，對本病不同血清型的感染皆缺乏或僅呈微弱交叉保護效力是已知的現象[11,13]，本次試驗給予第 1 和 2 型雞源雙價卵黃抗體製劑後，分別攻毒在台灣分離率亦高的第 6 型和第 11 型，結果顯示以被動免疫方式亦無法對第 6 型和 11 型形成交叉保護。

以鴨隻先注射卵黃抗體製劑後隔日攻毒之試驗模式，亦針對不同週齡鴨隻進行測試，結果顯示 1 劑量雞源卵黃抗體製劑除了對 2 週齡鴨隻可提供足夠保護外，其對 3、4 或 5 週齡鴨隻亦具有被動保護效果。而卵黃抗體於 3、4 或 5 週齡被動免疫時效力維持期之測試尚未完成，推測鴨（鵝）週齡愈長體型也愈大，其保護維持時間應較 2 週齡給予時可維持約 10 日的期限短。

本所目前並無發現台灣存有 RA-free 清淨水禽場，田間場鴨（鵝）污染本病程度不一，呈現高、中或低血清抗體力價，如要使用乾淨鴨（鵝）進行各項試驗有一定的困難度，因此我們退而求其次，所有鴨（鵝）均購自農委會畜產試驗所，以禽場單一化方式維持試驗鴨（鵝）一定程度的清淨。根據之前本所重複試驗的經驗，同一間水禽場但不同批次雞鴨（鵝）之 LD_{50} 有時亦不同，其 LD_{50} 有 $10^1 \sim 10^3$ 的差異，因此後來所有試驗均以 3~5 菌階攻毒（如攻毒第 1 型 RA 菌時，鴨： 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} ；鵝： 10^6 、 10^8 、 10^{10} ），而非採單一固定濃度（如 10 倍或 100 倍 LD_{50} ），以避免發生鴨（鵝）攻毒後有時出現免疫組與對照組全部死亡或全部存活的情形，最後造成無法計

算出 LD_{50} ，導致該次試驗結果無法評估。

本研究試驗結果表 1、2、6、7 和表 8 中，因試驗動物種別、週齡、血清型的不同或動物舍空間的安排，同一張表格中部份試驗為不同時間下所進行，試驗使用之卵黃抗體製劑亦為不同日期下所製備，試驗完成彙整結果時是以 2 或 3 項試驗結果合併於同張表格，以利於最終結果的呈現，因而出現同表格中卵黃抗體力價呈現一段範圍數值。如表 1 的效力試驗中三種目標動物即是於不同時程下分別完成測試，而受試動物數量不少，同一小批卵黃抗體製劑劑量不足以供應三次試驗使用，因此使用之前或之後 3~4 周製備的製劑一併進行試驗。

由研究結果分析，本所開發的抗第 1、2 型 RA 雙價卵黃抗體製劑，可有效提供鴨（鵝）對抗相同血清型 RA 感染的被動免疫保護效力。然而本次實驗室進行之各項動物測試，礙於動物舍空間安排與同時需要多菌階攻毒組數的限制，其受試鴨（鵝）每組僅有

3 隻，此樣本數不足可能造成試驗結果不具統計學上群體代表性，但由攻毒後免疫組與對照組的存活數分析，則已達到臨床上明顯的差異。未來需再進行重複測試，以其再現性進一步確認試驗結果的穩定性與精確度；此外，本所在 103 年亦將開始於水禽場進行各項田間應用試驗，屆時試驗鴨（鵝）數量的增加，其試驗成績應可充分顯現本所卵黃製劑實際的保護效果。

評估單劑量成本、產蛋動物本身乾淨度與其取得來源便利性，以及對三種目標鴨鵝被動保護效力成績的穩定性等因素，本研究決定未來僅以蛋雞生產系統進行量產製造抗本病的卵黃抗體製劑。而各項基礎研究與田間應用測試順利完成後，將來若取得動物用藥品製造許可證上市供應水禽養殖戶，預估可提升雛禽育成率與減少抗生素使用，避免動物用藥殘留並提高水禽肉品品質，造福水禽產業與人類健康。

Table 1 : Protectivity of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Peking ducks, Muscovy ducks and white Roman geese.

Animal	Challenge with serotype 1			Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	<u>Immunized</u> Survival rate %	<u>Nonimmunized</u> Mortality rate %	Variant CFU	<u>Immunized</u> Survival rate %	<u>Nonimmunized</u> Mortality rate %
Peking duck	10 ¹⁰	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ¹⁰	0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ⁹	66.7(2/3)	66.7(2/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁷	100(3/3)	33.3(1/3)	10 ⁷	100(2/2)	50(1/2)
Muscovy duck	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ⁸	66.7(2/3)	100(3/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ⁷	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	10 ⁶	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
	10 ⁵	66.7(2/3)	66.7(2/3)	10 ⁵	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
White Roman goose	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁶	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ⁴	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ²	100(3/3) ^a	66.7(2/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 3.39-5.78 and with tube agglutination antibody titers of 1:4-1:64.

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 2 : Protectivity duration of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Peking ducks.

Challenge time	Variant CFU	Challenge with serotype 1		Challenge with serotype 2	
		Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
5 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)	66.7(2/3)	66.7(2/3)
	10 ⁸	66.7(2/3) ^a	100(3/3)	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	100(3/3)	100(2/2)	50(1/2)
7 dpi	10 ¹⁰			0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹			100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁸			66.7(2/3)	50(1/2)
	10 ⁷			100(2/2) ^a	100(2/2)
8 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)		
	10 ⁹	33.3(1/3)	100(3/3)		
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)		
	10 ⁷	33.3(1/3)	100(3/3)		
9 dpi	10 ¹⁰			50(1/2)	100(2/2)
	10 ⁹			100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁸			100(3/3)	50(1/2)
	10 ⁷			100(2/2) ^a	100(2/2)
10 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)		
	10 ⁹	66.7(2/3)	100(3/3)		
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)		
	10 ⁷	66.7(2/3)	100(3/3)		

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 5.33-6.17 and with tube agglutination antibody titers of 1:8-1:32.

* dpi (days post inoculation of egg yolk antibody)

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 3 : Protectivity duration of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with the serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Muscovy ducks.

Challenge time	Variant CFU	Challenge with serotype 1		Challenge with serotype 2	
		Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
4 dpi	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)	66.7(2/3)	100(3/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	100(3/3)	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
	10 ⁵	66.7(2/3)	66.7(2/3)	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
8 dpi	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)	33.3(1/3)	66.7(2/3)
	10 ⁷	66.7(2/3)	66.7(2/3)	100(3/3)	33.3(1/3)
	10 ⁶	66.7(2/3)	66.7(2/3)	66.7(2/3)	0(0/3)
	10 ⁵	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	100(3/3)	33.3(1/3)
10 dpi	10 ⁸	0(0/3)	100(3/3)	66.7(2/3) ^a	66.7(2/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	100(3/3)	33.3(1/3)
	10 ⁶	66.7(2/3)	66.7(2/3)	100(3/3)	0(0/3)
	10 ⁵	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	100(3/3)	33.3(1/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with the S/N ratio in ELISA of 3.39 and with tube agglutination antibody titers of 1:4.

* dpi (days post inoculation of egg yolk antibody)

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 4 : Protectivity duration of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in white Roman geese.

Challenge time	Challenge with serotype 1			Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
5 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁶	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ⁴	66.7(2/3)	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	100(3/3)	10 ²	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
8 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁶	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁴	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	10 ²	33.3(1/3)	100(3/3)
10 dpi	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁶	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	0(0/3)	100(3/3)	10 ⁴	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁶	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	10 ²	33.3(1/3)	100(3/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 5.78 and with tube agglutination antibody titers of 1:32-1:64.

* CFU (colony forming unit of RA)

* dpi (days post inoculation of egg yolk antibody)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 5: Treatment effect of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Peking ducks.

Treatment time	Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	With treatment Survival rate %	Without treatment Mortality rate %
2 dpc	10 ¹⁰	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	66.7(2/3)	33.3(1/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
3 dpc	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁹	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ⁸	33.3(1/3)	33.3(1/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	66.7(2/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 5.33 and with tube agglutination antibody titers of 1:8.

* CFU (colony forming unit of RA)

* dpc (days post challenge with serotype 2 of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with treatment effect against RA challenges.

Table 6 : Cross protectivity of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against serotype 6 or 11 challenges in Peking ducks or Muscovy ducks.

Animal / Challenge serotype	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
Muscovy Duck/ Serotype 6	10 ¹²	0 (0/3)	100 (3/3)
	10 ¹⁰	33.3 (1/3)	0 (0/3)
	10 ⁸	66.7 (2/3)	0 (0/3)
	10 ⁶	100 (3/3)	0 (0/3)
Peking Duck/ Serotype 11	10 ¹²	0 (0/3)	100 (3/3)
	10 ¹⁰	100 (3/3)	33.3 (1/3)
	10 ⁹	100 (3/3)	0 (0/3)
	10 ⁸	100 (3/3)	0 (0/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 3.39-4.68 and with tube agglutination antibody titers of 1:4-1:16.

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

Table 7 : Protectivity of bivalent egg yolk antibodies collected from laying chickens immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges at 2 to 5 weeks of age in Peking ducks.

Weeks Of Age	Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
2 wks old	10 ¹⁰	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁹	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁸	100(3/3)	33.3(1/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
3 wks old	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁹	33.3(1/3)	66.7(2/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁷	100(3/3)	33.3(1/3)
4 wks old	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	66.7(2/3) ^a	66.7(2/3)
	10 ⁷	100(3/3)	33.3(1/3)
5 wks old	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	33.3(1/3)	66.7(2/3)
	10 ⁷	100(3/3) ^a	66.7(2/3)

* Egg yolk antibodies from laying chickens used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 3.39-4.68 and with tube agglutination antibody titers of 1:4-1:16.

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 8 : Protectivity of bivalent egg yolk antibodies collected from laying ducks immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Peking ducks and white Roman geese.

Animal	Variant CFU	Challenge with serotype 1		Challenge with serotype 2	
		<u>Immunized</u> Survival rate %	<u>Nonimmunized</u> Mortality rate %	<u>Immunized</u> Survival rate %	<u>Nonimmunized</u> Mortality rate %
Peking Duck	10 ¹⁰	0(0/3)	100(3/3)	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁹	33.3(1/3)	100(3/3)	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	66.7(2/3)	33.3(1/3)	33.3(1/3)
	10 ⁷	66.7(2/3)	33.3(1/3)	100(3/3) ^a	66.7(2/3)
White Roman Goose	10 ⁶	—	—	66.7(2/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁴	—	—	66.7(2/3) ^a	100(3/3)
	10 ²	—	—	100(2/2)	0(0/3)

* Egg yolk antibodies from laying ducks used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 16.22-20.57 and with tube agglutination antibody titers of 1:2-1:16.

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

* — : not done

Table 9 : Protectivity duration of bivalent egg yolk antibodies collected from laying ducks immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in Peking ducks.

Challenge time	Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
5 dpi	10 ¹⁰	0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹	0(0/3)	66.7(2/3)
	10 ⁸	100(3/3) ^a	100(3/3)
	10 ⁷	50(1/2)	50(1/2)
7 dpi	10 ¹⁰	0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	66.7(2/3)	50(1/2)
	10 ⁷	100(2/2) ^a	100(2/2)
9 dpi	10 ¹⁰	0(0/2)	100(2/2)
	10 ⁹	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁸	66.7(2/3)	50(1/2)
	10 ⁷	50(1/2)	100(2/2)

* Egg yolk antibodies from laying ducks used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 19.9 and with tube agglutination antibody titers of 1:2.

* dpi (days post inoculation of egg yolk antibody)

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

Table 10 : Protectivity duration of bivalent egg yolk antibodies collected from laying ducks immunized with serotype 1 and 2 of *Riemerella anatipestifer* bacterin, against homologous challenges in white Roman geese.

Challenge time	Challenge with serotype 2		
	Variant CFU	Immunized Survival rate %	Nonimmunized Mortality rate %
3 dpi	10 ⁶	66.7(2/3)	100(3/3)
	10 ⁴	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ²	100(3/3) ^a	100(3/3)
5 dpi	10 ⁶	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ⁴	0(0/3)	100(3/3)
	10 ²	33.3(1/3)	100(3/3)
8 dpi	10 ⁶	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁴	66.7(2/3) ^a	100(3/3)
	10 ²	0(0/3)	100(3/3)
10 dpi	10 ⁶	0(0/3)	100(3/3)
	10 ⁴	33.3(1/3)	100(3/3)
	10 ²	0(0/3)	100(3/3)

* Egg yolk antibodies from laying ducks used for passive immunizing birds were found with S/N ratio in ELISA of 16.22 and with tube agglutination antibody titers of 1:32.

* dpi (days post inoculation of egg yolk antibody)

* CFU (colony forming unit of RA)

* Survival rate % [(number of survival birds/total challenged birds) x 100%]

* Mortality rate % [(number of dead birds/total challenged birds) x 100%]

* ^a : the tested egg yolk antibodies with passive protection against RA challenges.

參考文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。動物用藥品檢驗標準(II)。2012。
2. 袁濤、聶奎。鴨卵黃免疫球蛋白IgY研究進展。現代畜牧獸醫2:51-54, 2006。
3. 陳燕萍、李淑慧。台灣水禽雷氏桿菌症血清型別之調查。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告43:35-42, 2008。
4. 陳燕萍、李淑慧、蔡向榮。2008年至2012年台灣水禽雷氏桿菌症血清型別調查。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告48:21-28, 2013。
5. 黃國安。鴨疫黎氏桿菌(*Riemerella anatipestifer*)毒力相關蛋白基因vapD1之次單位疫苗及DNA疫苗建構及對鴨隻免疫保護效果。碩士論文, 國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
6. 喻昭芳、黃金城。水禽雷氏桿菌症3價不活化菌苗之效力試驗。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告44:63-71, 2009。
7. 喻昭芳、黃天祥、黃金城。以雞蛋與鴨蛋生產抗水禽雷氏桿菌症卵黃抗體之研究與效力試驗。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告47:1-12, 2012。
8. 劉瑞珍、劉振發、張致維、黎煥耀、戴謙、陳立人。分子牧場之應用與開發-I以母雞微生物工廠生產抗腸病毒71型IgY抗體。農業生業產業季刊10:34-41, 2007。
9. 劉育宗。鴨*Riemerella anatipestifer*感染症之研究:保菌及排菌研究、聚合酶連鎖反應診斷技術之建立及外膜蛋白A基因序列分析。碩士論文, 國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
10. Higgins D.A., Henry R.R. and Kounev Z.V. Duck immune response to *Riemerella anatipestifer* vaccines. *Developmental and Comparative Immunology* 24:153-167, 2000.
11. Huang B., Subramaniam S., Frey J., Loh H., Tan H.M., Fernandez C.J., Kwang J. and Chua K.L. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P45N') of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology* 84:219-230, 2002.
12. Layton H.W. and Sandhu T.S. Protection of ducklings with a broth-grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. *Avian Diseases* 28:718-726, 1984.
13. Sandhu T. Immunization of white Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. *Avian Diseases* 23:662-669, 1979.
14. Sandhu T.S. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella antipestifer* vaccine in white Pekin ducklings: laboratory and field trials. *Avian Pathology* 20:423-432, 1991.

Efficacy Study on Passive Protection with Egg Yolk Antibodies against *Riemerella anatipestifer* Infection in Ducks and Geese

CF Yu*, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The safety, efficacy and duration of protection of egg yolk antibodies against serotype 2 of *Riemerella anatipestifer* (RA) infection were studied in ducklings and goslings. Various tests on bivalent egg yolk antibodies against serotype 1 and 2 of RA infection have been conducted. The results showed that both bivalent egg yolk antibodies isolated from chicken or duck lines were efficacious against homologous challenges. The passive immunization protection stayed for five to ten days in Peking ducks, Muscovy ducks and white Roman geese. In addition, the bivalent antibodies were effective for treatment for challenges less than 10^7 CFU/mL. However, there was no cross protection against heterologous serotype challenges. Considering the production cost, source of pathogen-free lines as well as reproducibility of efficacy tests, we have chosen chicken lines as a biofactory for future antibody production. Egg yolk antibodies generated in these could provide passive protection against the same serotypes of RA infections in ducks and geese field populations in the future.

Keywords: *Riemerella anatipestifer* infection, egg yolk antibody, efficacy, treatment, cross-protection.

