

鷄產蛋下降症(EDS-76)血球凝集抗原 及不活化疫苗之開發

呂榮修¹ 林地發¹ 蔡向榮¹ 李全¹ 李永林¹
邱仕炎¹ 劉永和² 黃士則¹

以本省分離TN株EDS-76病毒在鴨胚胎增殖後以0.2%福馬林去活化製成冷凍乾燥HA抗原，其力價穩定，在4℃保存一年後仍保持其原有力價。

又以TN株研製氫氧化鋁膠及油質不活化疫苗，經在實驗室或在野外試驗結果證實其安全性及免疫抗體之產生皆佳，其中尤以油質疫苗較佳，4週齡雞在接種2週後，其平均HI抗體力價已達20倍，其HI抗體至少可維持6個月，其防禦效果甚佳。

經大量製造油質不活化疫苗424,000劑量，其中14,040劑量供宜蘭縣鴨隻接種外，全部供應本省10個縣市之種雞場使用，對本病之控制獲得良好的保護效果。

雞產蛋下降症(Egg Drop Syndrome - 1976, EDS-76)於1976年由荷蘭van Eck⁽¹⁾最初報告之後，經Mc Ferran⁽²⁾，Mc Cracken and Mc Ferran⁽³⁾，Baxendale⁽⁷⁾相繼分離到血球凝集性腺病毒，並以人工感染方式證實為本病之病原體。

本病多發生於歐洲各國及日本，對盛產中之蛋雞突然引起產蛋率下降，且會產些無殼蛋，軟蛋，退色蛋，薄殼蛋等異常卵，又其病程頗長，對農民損失至鉅^(1, 4, 6, 9, 10, 11)。

本省自從1982年在台南、新竹、高雄及台中縣等地養雞場爆發EDS-76並由筆者等⁽⁵⁾分離病毒成功而證實EDS-76在台灣的發生後有逐漸擴大蔓延的趨勢，為了有效的防疫EDS-76在本省之為害，特研究開發EDS-76血球凝集抗原及不活化疫苗以供本病之診斷及預防之用。

試驗材料與方法

一、血球凝集反應(HA test)及血球凝集抑制試驗(HI test)如前述之方法^(1, 2)在微量力價測定盤實施。

二、EDS-76血球凝集用抗原之研製：

使用台灣分離之TN毒株^(1, 2)，接種於雞胚胎尿膜腔內經過4~6日致死後，採取感染尿液(HA titer 16,384~32,768倍)，以Formalin 0.2%不活化(HA titer 16,384倍)，加等量之含有1% Sodium glutamate, 1% gelatin, 20% Lactose等保護劑後冷凍乾燥而成。

三、乙醚(Ethyl ether)及福馬林(Formalin)對EDS-76 HA抗原之影響：

將TN毒株鴨胚胎感染混合尿液(HA titer 1024~65,536倍)6批，其中4批添加等量乙醚，在37℃感作60分鐘，2批添加0.2% Formalin，在37℃感作24小時，於感作前後分別測定其HA力價。

四、試驗EDS-76 HA冷凍乾燥抗原之保存試驗：

試製之EDS-76冷凍乾燥HA抗原分別在HA抗原乾燥前，添加保護劑後，冷凍乾燥後，及在4℃，37℃與室溫保存3天、7天、14天、1個月、2個月、3個月、4個月及1年後分別測定其血球凝集力價。

五、疫苗之製造：

病毒使用 1982 年分離之 TN 株^(4,5)，製造基質分為兩種原料，1 種為細胞感染病毒，即 DEF 病毒 (HA 價 2,048 倍) 及 DK 病毒 (HA 價 4,096 倍)，另外 1 種係 DE 尿液 (HA 價在 16,384 ~ 32,768 倍)，病毒經 Formalin 0.2 w/v % 不活化後，加同量之氫氧化鋁膠 (Al(OH)₃) 或油質佐劑 (oil adjuvant) 為自製之 Freund's adjuvant (流動石臘 8.5ml、ArlacelA 1.5ml)，抗原與佐劑用 20KHz 超音波 Sonication 變為 Water in oil - in water 狀態之乳白色不活化疫苗。

六疫苗之安全及效力檢定：

依照經濟部頒佈之檢驗標準施行

1. 安全試驗：選 2 ~ 4 週齡，無 EDS - 76 抗體健康雞 20 隻，任取 15 隻，各肌肉接種 1 劑量 (10 隻) 及 2 劑量 (5 隻)，餘 5 隻為對照，接種後觀察 3 週，須無明顯呼吸器症狀及神經症狀。
2. 力價試驗：上述安全試驗接種 1 劑量雞於疫苗接種後 21 日採血，測定 HI 抗體，結果疫苗接種組之幾何平均值須 20 倍以上，對照組須為陰性。

七油質不活化疫苗之大規模田間應用

依前述之疫苗製造方法大規模製造油質不活化疫苗 42 萬 4 仟劑量大規模應用於田間，其中除 14,040 劑量係供應宜蘭縣鴨隻接種外，其他全部供應全省 10 個主要種雞場所在縣市的種雞場使用，其詳細接種情形見表 1。

表 1 EDS - 76 油質不活化疫苗之野外應用情形 *

縣	市	接 種 動 物	接 種 隻 數
台 南	縣	種 雞	110,000
台 中	縣	"	100,000
高 雄	縣	"	20,000
屏 東	縣	"	20,000
嘉 義	縣	"	34,000
雲 林	縣	"	30,000
彰 化	縣	"	25,000
桃 園	縣	"	45,000
台 北	縣	"	17,960
台 南	市	"	8,000
宜 蘭	縣	鴨	14,040
合	計		424,000

*本野外應用期間係自民國 72 年 12 月至 73 年 2 月間實施。

結 果

一 EDS - 76 血球凝集抗原對乙醚及福馬林之影響：

以 TN 株病毒尿液中添加 50 % 乙醚，放置 37 °C，60 分鐘，測定處理前後之 HA 價，結果有些樣品並未受影響，但有些降低 2 凝集單位，但如加 0.2 % 福馬林予以不活化，並無影響 (表 2)。

表2 EDS - 76 HA 抗原對 Ethyl ether 及 Formalin 之影響

抗原 No.	處理方法	HA 價	
		前	後
1		4,096	4,096
2	Ethyl Ether 添加 50%，37°C 60 分鐘	32,768	65,536
3		16,384	8,192
4		1,024	512
1	Formalin 加 0.2%，37°C 24 小時	4,096	4,096
2		65,536	65,536

三、EDS-76 冷凍乾燥血球凝集抗原之保存試驗：

研製之 EDS-76 冷凍乾燥 HA 抗原，經測定力價為 2048 凝集單位後觀察至現在（12 個月），如放置室溫 3 個月後已降低為 128 凝集單位，至 4 個月後已失去凝集能力。又如 37°C 則在 2 週內失去凝集能力。如放置在冰室（4°C）保存則 12 個月後其力價仍然不變（圖 1）。

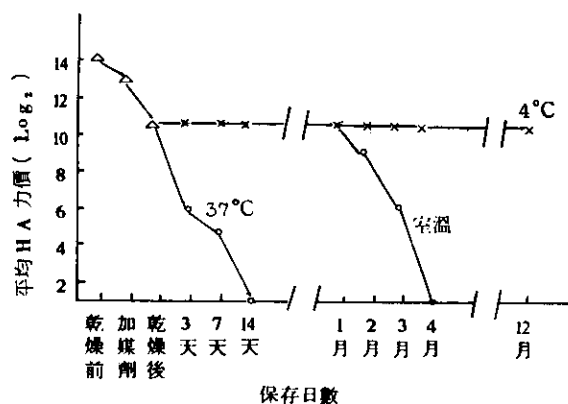


圖 1 試製 EDS - 76 HA 冷凍乾燥抗原之保存試驗

三、試製疫苗之安全性

對 4 週齡健康而無 EDS-76 HI 抗體肉雞各 15 隻，經接種研製之氫氧化鋁膠不活化疫苗及油質不活化疫苗 1 劑量（各 10 隻）及 2 劑量（各 5 隻），觀察至接種後 3 週為止，均未發現呼吸及神經症狀，又將試製疫苗應用於 20 週齡肉用種雞一批 4,500 隻，在產蛋時未發現異形蛋及破蛋。

四、試製疫苗之免疫效果

試製之氫氧化鋁膠不活化疫苗，經接種於 4 週齡雞後，其 HI 抗體於第 7 日略為上昇為 2 倍，然後至第 2 週升高為 10 倍，8 週後為 HI 抗體高峯為 20 倍，以後逐漸下降為 5 倍並持續至第 23 週之久（圖 2）。而油質疫苗經接種後，其 HI 抗體之上昇比氫氧化鋁膠為佳，第 1 週之平均 HI 價有 7.4 倍，2 週後已達 20 倍，至第 9 週為最高峯，其幾何平均 HI 價有 50 倍，以後略有下降，但至 23 週後仍保持 13 倍之 HI 價（圖 2）。

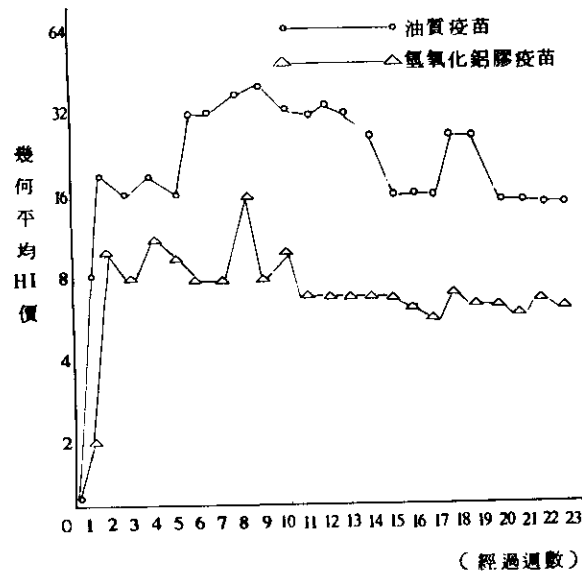


圖 2 氫氧化鋁膠疫苗及油質疫苗免疫接種雞之 HI 抗體產生比較

經試製之氫氧化鋁膠疫苗應用於田間一蛋雞場，A 及 B 棟均飼養 2,000 隻蛋雞，而在 260 日齡時，A 棟蛋雞接種 1 次氫氧化鋁膠疫苗，而 B 棟為未接種疫苗之對照，在 320 日齡時感染並發生症狀，B 棟雞群發生產蛋驟降，由數%開始至 15%，發病後 6 週始復原，但疫苗接種之 A 棟雞群未見產蛋下降之症狀（圖 3）。

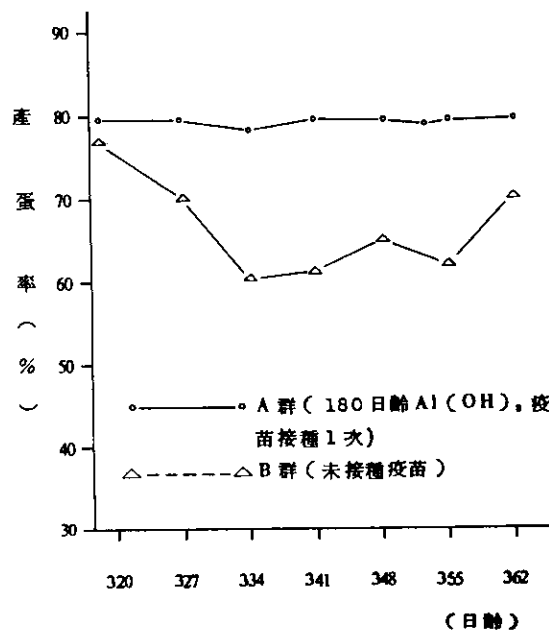


圖 3 接種氫氧化鋁膠 (Al(OH)₃) 疫苗對自然感染之防禦效果

討 論

EDS-76 被發掘的歷史不長，在短短數年本病已侵襲歐洲各國^(6,9,11)，並引起世界各國對本病之重視，主要原因，由於該病發生後，產蛋率由數%甚至 50% 以下之急劇下降，病雞產生無殼蛋，薄殼蛋，退色蛋以及日益增加之破蛋為煩且其病程可達 4~10 週之久^(4,8,10)。本病如在產蛋開始前被感染，就無法達到產蛋頂峯又在盛產期過後被感染即產蛋會突然下降⁽⁹⁾。

對於 EDS-76 之控制，早在歐洲從本病發現後不久就已著手研究，如 Baxendale⁽⁷⁾ 以 EDS-76 病毒之 BC-14 株，經 Formalin 不活化後，製成油質疫苗，接種 0.5ml 於 19 週齡雞之皮下，經過 10 週後，用野外流行株之 M-13 株病毒，以 $10^{7.0}$ PFU 點眼接種攻擊，結果疫苗接種組耐過，而對照組之未接種疫苗組，即從第 6 日開始至 24 日有顯然之產蛋下降，又以同樣的方法製造油質疫苗 (Nobir - vac EDS-76)，應用在田間大規模試驗，在含有 HA 價 400~800 倍/劑量之本疫苗，僅祇 1 次免疫，得保護至 39 週齡未受到 EDS-76 之自然感染，在日本所開發之疫苗，以 AI (OH)，疫苗為主^(8,9)。或許本疫苗對雞接種後較不易引起局部反應有關。

對疫苗之開發，經探討製造用材料結果以鴨胚胎尿液具較高之 HA 價 (16,384~32,768 倍)，比其他細胞培養液毒 (HA 價 2,048) 為高。因此選用鴨胚胎較多繼代毒接種於鴨胚胎後，收集 4~9 日之感染尿液為製造用原料，疫苗佐劑原則上照 Freund's adjuvant 處方配製或略為改方使用。病毒液為疫苗量之 20 或 10% 之比率配製，經試驗之疫苗在品質上與外國製疫苗比較毫無遜色。

油質疫苗與氫氧化鋁膠疫苗相較之下，在安全性上並無差異，但對雞隻之免疫，油質疫苗在 HI 抗體與抗體之持續均遠比氫氧化鋁膠疫苗優異。但研製之氫氧化鋁膠疫苗竟在田間應用，經 1 次接種氫氧化鋁膠疫苗 A 棟雞群，接種後 60 日曾感染野外毒致未接種疫苗之 B 棟雞群即發生產蛋下降，15% 至 6 週後始恢復，而疫苗接種過之 A 群並無產蛋下降症狀，Baxendale 等⁽⁷⁾ 亦報告，使用油質疫苗之雞群，其抗體陽性率 12 隻中只有 2 隻陽性之狀態下亦能耐過自然感染，又表示 HI 價雖然在 2 倍以下血清，如用斑點 (Plaque) 減少法測定中和抗體仍有 20~80 倍，因此對本病之控制，疫苗之使用仍不失為最佳方法。

又氫氧化鋁膠疫苗比油質疫苗，其 HI 抗體之產生能力較弱，而且免疫持續力又短，因此如要獲得如油質疫苗之同等抗體價，必須反復接種 2~3 次，對於此點，以採卵為目的並且需要長期保持免疫狀態為目的之雞群，油質疫苗比氫氧化鋁膠疫苗為佳。

對於本病之抗體測定方法，有中和試驗，免疫擴散法及 HI 試驗為特異性極高且甚為簡便而被世界各國所常用^(4,9)，以感染尿液加適當媒劑所研製之冷凍乾燥 HI 用抗原，其力價甚為穩定，可提供為本病之診斷及研究之用。

誌 謝

本計劃承蒙前行政院農業發展委員會 (現農業委員會) 以 72 農建-2.2-產-229 計畫補助經費得以完成，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. 呂榮修、林地發、蔡向榮、李永林、邱仕炎、李全、黃士則。1985。台灣雞產蛋下降症 (EDS-76) 之發生及病毒性狀之研究。中華民國獸醫學會雜誌。11: 157-165。
2. 蔡向榮、林地發、呂榮修、邱仕炎、黃士則、李永林、李全。1983。產蛋下降症 (EDS-76) 病毒在不同細胞培養及溫度之增殖。中華民國獸醫學會雜誌。9: 133-138。
3. 東原稔，口高濤子，高井伸二，寶蓮勉。1980。Egg drop syndrome-1976 (EDS-76) 不活化ワクチンについて，第 90 回日本獸醫學會講演旨，172。

- 4.川村齊，1980年。産卵低下症候群(EDS-76)。雞病研報，16，1-6。
- 5.野中富士男，松尾和夫，高瀬公三，山田進二。1981。EDS'76不活化ワクチンの免疫効果，第91回日本獣醫學會講演要旨161。
- 6.Baxendale,W. 1978. Egg drop syndrome. Vet. Rec. 102 : 285-286.
- 7.Baxendale,W. , Lutticken, D. R. Hein and I. Mcpherson. 1980. The results of field trials conducted with an inactivated vaccine against the egg drop syndrome 1976 (EDS-76). Avian Pathol. 9 : 77-91.
- 8.McCracken, R. M. and J. B. McFerran. 1978. Experimental reproduction of the egg drop syndrome 1976 with a haemagglutinating adenovirus. Avian Pathol. 7 : 483-490.
- 9.McFerran, J. B., H. M. Rowley, M. S. McNulty and L. J. Montgomery. 1977. Serological studies on flocks showing depressed egg production. Avian Pathol. 6 : 405.
- 10.McFerran, J. B., R. M. McCracken, E. R. McKillop, M. S. McNulty and D. S. Collins. 1978. Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland. Avian Pathol. 7 : 35-47.
- 11.van Eck, J. H. H. , Davelaar, F. G. , van der Heuvel - Plesman, T.A.A. van Kol, N. B. Koumenhoven and F. H. M. Guidle. 1976. Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. Avian Pathol. 5 : 261-272.

**DEVELOPMENT AND FIELD APPLICATION OF DIAGNOSTIC
ANTIGEN AND AN INACTIVATIVE VACCINE AGAINST
EGG-DROP SYNDROM-1976**

Y. S. Lu¹, D. F. Lin¹, H. J. Tsai¹, C. Lee¹, Y. L. Lee¹, S. Y. Chiu¹
Y. H. Lieu² and S. T. Huang¹

The preparation of the hemagglutinating antigen for diagnosis of Egg-Drop Syndrome-1976 (EDS-76) was described. The antigen multiplied in duck embryo, was inactivated with 0.2% formalin and then was lyophilized. The lyophilized antigen could maintain its HA titre at least one year in 4°C.

Formolized inactivated vaccine in oil adjuvant and in aluminum hydroxyl gel were prepared. It is found that both kinds of inactivated vaccines were safety and effective in the evoking of the antibody against EDS-76. It is also suggested that the immunogenicity of the oil vaccine was greater. The mean HI titre of antibody against EDS-76 in the inoculated chicken was above 1:20 at two weeks post inoculation. The HI titre lasted at least for 6 months.

Large scale application of the inactivated vaccine in oil adjuvant against EDS-76 was carried out. Total of 409,960 breeder chicken and 14,040 ducks were inoculated and good protection against EDS-76 infection was achieved.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tamsui, Taiwan, R.O.C.
2. Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C.

