

在臺灣鴨病毒性肝炎耐 過鴨血清緊急防治試驗

呂榮修、李永林、謝快樂、陳忠松、林再春、陳守仕

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

自1970年以來，在高屏地區突然發生小鴨之急性傳染病並呈大流行，後經筆者等³⁾於1971年4月，始由高雄縣湖內鄉病例，以雞胚胎及鴨腎細胞分離病毒成功，並以免疫血清學性狀而確定與Levine (1950)⁴⁾所報告之鴨病毒性肝炎能完全一致。

對鴨病毒性肝炎之緊急防治，早由Levine⁴⁾，白坂⁷⁾等所指摘，可使用本病耐過鴨血清，因此在本省尚未開發活毒疫苗之前，能有效控制本病之猖獗，為阻止繼續蔓延死亡起見，乃選擇高雄縣從事專門製造耐過鴨血清，並大量供應疫區小鴨羣之緊急防治需要，結果自1971年9月初試成功，因所得成績斐然，故由區域性漸至全面性防治，因能及時制壓本病之大流行，留下初次在臺灣所發生鴨病毒性肝炎防疫史上輝煌之業績。

材料與方法

1. 供試病毒：中和試驗所使用之病毒，係使用1971年在湖內鄉所分離之高雄 418毒株，均分別通過雞胚胎20代 (EID_{50} 有 $10^{6.0} \sim 10^{7.0}$)及鴨腎細胞10代者 (對鴨腎細胞之感染價有 $10^{6.0} \sim 10^{6.64}$ PFU/ml)。
2. 鴨腎細胞之製備：2週齡至8週齡之健康鴨，採取腎臟後，以0.25% Trypsin 消化4~5次，消化細胞使成爲0.4~0.6% 浮遊於增殖培養液中 (含有0.5% Lactalbumin hydrolysate, 0.1% Yeastolate, 5% bovine serum, 及每ml含有100units之Penicilline, 100 μ g之dihydrostreptomycin之Earles solution) 分裝於5.5cm之平皿各5ml, 在37°C 培養第2至第3日換液後形成單層細胞，即可供爲中和試驗之用。
3. 供試蛋：由本所指定無或低新城鴨瘟抗體雞所生產之雞蛋 (新城鴨瘟死毒疫苗製造用) 供試，一般使用6~7日發育雞蛋。
4. 感染價及中和價之測定：沿用病毒稀釋法：

供試血清以原或5倍固定稀釋後，在56°C 30分鐘非働性化後，加等量於經10進法遞減稀釋之病毒液中，使其完全混合，並置冰室感作一夜後，將以各階段之病毒，血清混合液之0.1ml，接種於6~7日齡雞蛋4~5個，另接種未加血清之病毒稀釋液爲對照，接種蛋應每日觀察2次，識別有無死亡，如接種後第7日尚生存者，仍要剖檢觀察有無本病毒所引起之特徵的病變 (萎縮、水腫、胎兒肝綠色化、壞死、出血)。如出現病變即認爲感染蛋，以Behrens-Kärber法，求其感染價 (EID_{50})。

如使用鴨腎細胞，即依上述各稀釋階段之病毒血清混合液0.4ml，接種於培養面，於室溫吸着4小時後，加第1寒天培養液，在37°C 孵育，至第2日後，再加第2次寒天培養液，繼續培育，翌日計算該所出現之Plaque數。

中和價之算出均求出與其所使用對照毒之感染價之差數為中和價。

照白坂之判定標準，中和價對數1.7以上為陽性，1.0~1.7為疑陽性，1.0以下者為陰性。

5.耐過鴨血清之製造工程；供為屠宰之肉鴨羣，必須具有本病發生病歷，死亡率在10%以上者為採集對象。經收集之血液凝固物，經處理後，分離血清，並測定中和抗體價，如有 log2.5 以上時，混合成批數冷凍保存，使用前加防腐劑一血清用石碳酸（含Phenol 0.5%，Glycerin 0.05%）。

6.注射方法；接種於小鴨之大腿部肌肉內每隻0.5ml。

試驗成績

(一) 鴨病毒性肝炎耐過鴨之中和抗體消長情形：

在疫區所飼養之小鴨，經感染本病或不顯性感染耐過之後，自第7日中和抗體產生，至第14日升高至 1.25至4.75 (log)，30日後一般高達2.5~5.0之間，如圖1所示，該高力價之中和抗體能持續至120日以上，為本試驗所採集之血清，均自60日齡前後之肉鴨所得，該期之中和抗體價均在 log3.25~5.0 之間，因此不難想像對小鴨能賦予被動免疫效果。

(二) 小鴨經接種本病耐過鴨血清之後，所受容抗體在體內消長情形。

含有中和抗體 log3.0 至 3.75之耐過鴨血清，經接種於孵化直後之1日齡小鴨大腿部肌肉，該抗體經授受後，能維持14日尚有1.5至2.5，但至21日後，逐漸下降至 1.25至 0.5之間，如圖2所示。對本病起病最具高度感受性之14日齡內，可控制本病之發生。

(三) 疫區耐過鴨之疫情調查，血清採集量及中和抗體之測定。

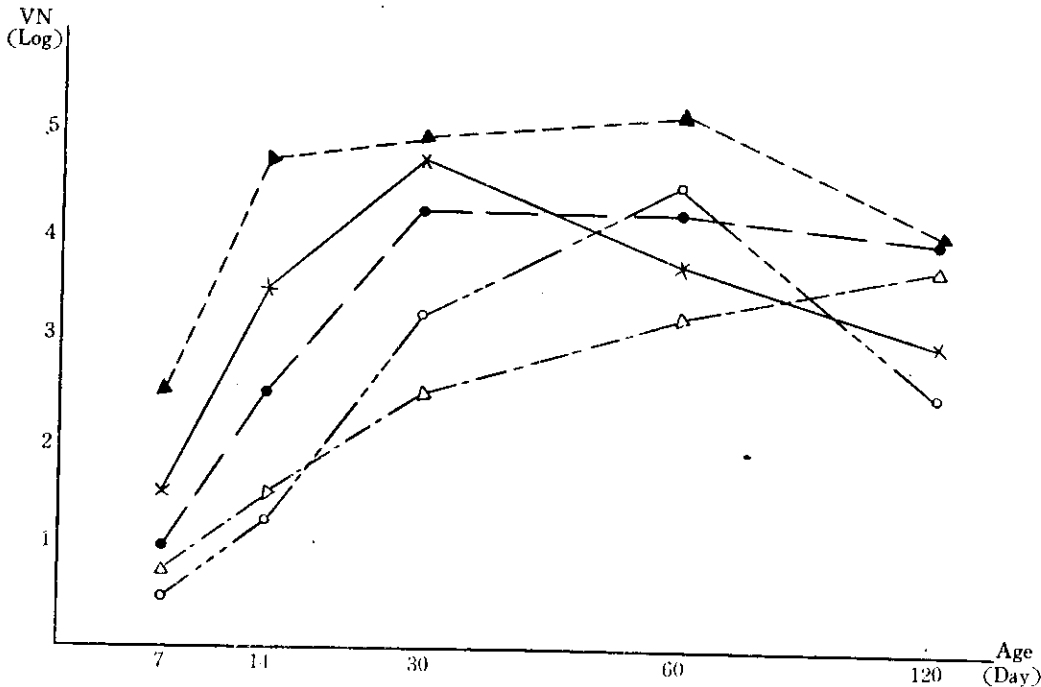


Fig. 1. The Titers of Neutralizing Antibody of Ducks Recovered from DHV Infection

從60年7月起開始在疫區湖內鄉從事疫情調查，曾感染本病而死亡率達10%以上，供為屠宰之鴨羣為採血對象。由表1所示，經調查之屠宰鴨羣，在3週齡內其發生死亡率在10~50%，平均26%。每隻鴨放血後，平均每隻能收集 20ml 之血清量，由圖3所示，自60年7月至 61年12月，僅在高雄縣採集162批血清，共儲存 7813600ml，供檢血清中和價在 log 3.5~4.75。

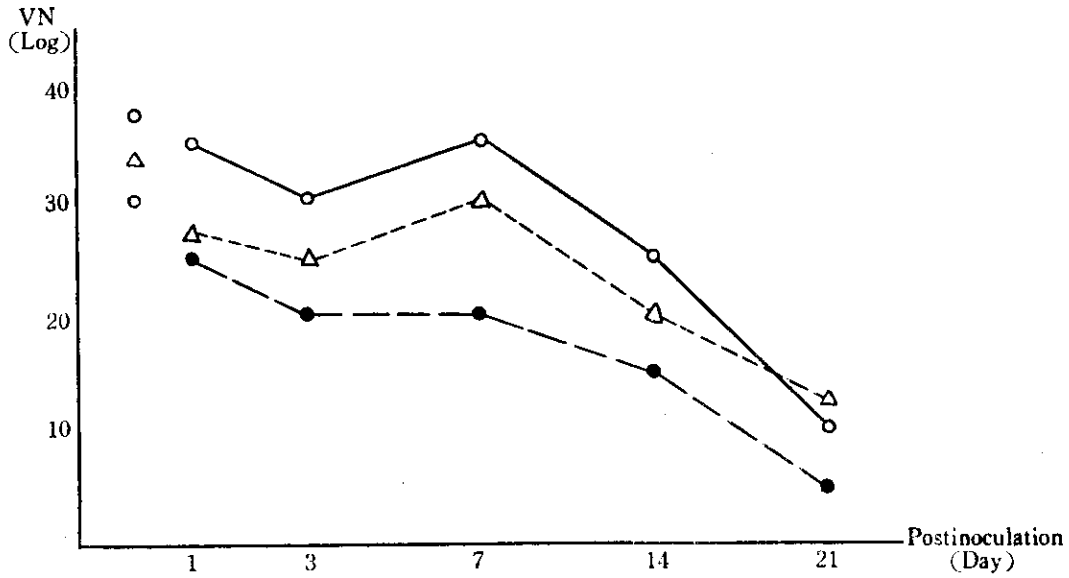


Fig. 2. The Persistence of Antibody in day-old Ducklings Inoculated with Anti-DHV Serum Collected from Recovered Ducks

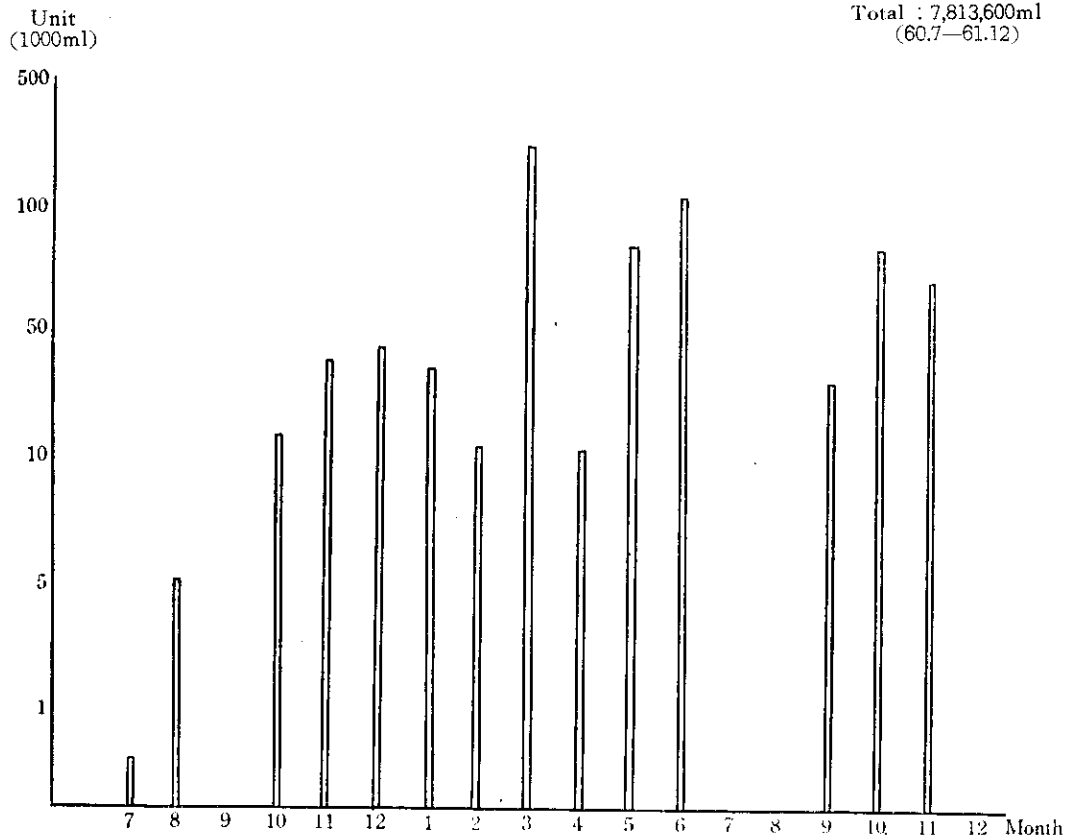


Fig. 3. The Volume of Anti-DHV Serum Collected from Recovered Ducks in Kaohsiung Shien

(四) 鴨病毒性肝炎耐過鴨血清對未感染小鴨羣之防治試驗成績。

自60年9月下旬起在高雄縣實施緊急防治試驗，對觀察認為未感染之鴨羣11,100隻，經接種本病耐過鴨血清後，觀察1個月，經統計其死亡率即注射組為0~1.0%，平均0.38%，對照組是2.2~13%，平均4.41%，注射羣之防禦效果較佳，成績如表2。

(五) 鴨病毒性肝炎耐過鴨血清對已感染發生羣之防治效果。

在疫區已被感染發病之小鴨羣5，經接種耐過鴨血清者4,700隻，對照未注射者1,770隻。結果注射組之死亡率僅0.1~1.9%，平均0.91%，未注射之對照組即8.6~60%，平均20%，注射組者，對阻止本病之發病死亡效果，甚為顯著如表3，所示成績斐然。

(六) 在高雄縣及宜蘭縣使用鴨病毒性肝炎耐過鴨血清緊急防治試驗：

在高雄縣從60年9月起，對小鴨普遍實施耐過鴨血清接種，至61年12月止之統計，在這16個月期間，對未感染健康小鴨羣一共接種1,390,145隻，其中斃死5,260隻，死亡率在0.37%。對已感染小鴨羣一共接種97,834隻，斃死1,862隻，斃死率1.9%。總括在高雄縣接種1,487,979隻，其中斃死7,122隻，死亡率僅0.48%。另在宜蘭縣自61年1月至12月，計一年中共接種600,000隻，斃死隻數6,195隻，斃死率僅0.1%。自60年9月至61年12月，統計高雄、宜蘭兩地一共接種2,087,979隻，斃死13,303隻，死亡率0.63%。其他縣市所應用者未列在內，如表4，所示此龐大應用數目，曾挽救無數小鴨生命，為保障養鴨事業發揮無比功效。

Table 1. The Results of Epidemic Investigation of Recovered Ducks, Volume of Collected Antiserum, and Measure of Neutralizing Antibody

Lot No.	Date of Outbreak	Location	Mortality ※ (%)	Date of Bleeding	Number of Ducks	Volume of Antiserum	Titer of VN (log)
1	60.5	Hunei	22	60.7	40	500	4.5
2	60.6	〃	17	60.8	40	500	4.5
3	60.6	〃	10	60.8	40	800	1.5
4	60.6	〃	10	60.8	70	1,500	3.5
5	60.6	〃	25	60.8	90	2,000	4.5
6	60.7	〃	46	60.10	60	1,100	4.5
7	60.7	〃	13	60.10	60	1,000	4.5
8	60.7	〃	10	60.10	70	1,200	4.5
9	60.8	〃	21	60.10	25	400	4.5
10	60.8	〃	34	60.10	100	2,000	4.5
11	60.8	〃	42	60.10	65	1,200	4.75
12	60.8	〃	50	60.10	150	3,500	4.5
13	60.8	〃	40	60.10	100	2,000	5.0
14	60.8	〃	20	60.10	60	1,000	4.5
15	60.8	〃	20	60.10	110	2,000	4.75
Total					1,080	20,700	

Note : ※ Mortality was 26% in average

Table 2. Protective efficiency of DHV specific antisera in uncontaminated ducklings

Groups	Date	Age inoculated	Number raised	No. of past outbreaks	Passive immunity			Controls		
					Number inoculated	Number died	Mortality	Number inoculated	Number died	Mortality
1	60.9	1	1,900	2	1,000	8	0.8	900	20	2.2
2	60.9	1	1,400	3	800	8	1.0	600	19	3.2
3	60.9	1	2,000	2	1,520	6	0.4	480	13	2.7
4	60.10	1	2,400	2	2,000	6	0.3	400	29	7.3
5	60.10	1	1,300	2	1,100	4	0.4	200	26	13.0
6	60.11	3	2,100	4	2,100	0	0.0	300	20	6.7
Total			11,100		8,520	32	0.38	2,880	127	4.41

Table 3. Protective efficiency of specific antisera in DHV-contaminated ducklings

Groups	Age inoculated	Number raised	Date	No. died before treatment	Number inoculated *1	Number died	Mortality (%)	Number inoculated *1	Number died	Mortality (%)
1	4	2,500	60.9	500	1,500	29	1.9	500	150	30.0
2	7	1,300	60.10	200	600	9	1.5	500	43	8.6
3	5	1,600	60.10	30	900	2	0.2	670	94	14.0
4	11	1,200	60.10	200	200	0	0.0	800 ^{*2}	0	0.0
5	6	2,000	60.10	400	1,500	2	0.1	100	60	60.0
Total					4,700		0.91	1,770	347	19.6

Notes : *1. Each ducklings was intramuscularly inoculated with 0.5 ml of DHV specific antisera.

*2. This group of ducklings was clinically recovered, and was not included in the total number counted.

Table 4. Results of emergency control, using sera from DHV—recovered ducks, in Kaohsiung and Ilan prefecture

	Month	Uninfected duckling flocks			Infected duckling flocks		
		No. of birds inoculated	No. of birds died	Mortality (%)	No. of birds inoculated	No. of birds died	Mortality (%)
Kaohsiung Prefecture	Sep.	4,820	22	0.45	1,500	40	2.7
	Oct.	13,800	19	0.14	7,400	142	1.9
	Nov.	53,000	320	0.06	5,400	132	2.5
	Dec.	38,700	289	0.76	2,000	47	2.3
	Jan.	54,580	250	0.45	6,300	160	2.53
	Feb.	88,350	260	0.29	9,000	175	1.94
	Mar.	223,920	950	0.42	11,200	190	1.69
	Apr.	170,100	750	0.44	12,900	220	1.70
	May	161,648	560	0.34	8,190	150	1.83
	Jun.	108,440	300	0.27	7,494	100	1.33
	Jul.	107,070	320	0.29	5,100	90	1.76
	Aug.	91,617	310	0.33	3,900	86	2.20
	Sep.	65,000	220	0.33	2,150	50	2.32
	Oct.	75,000	230	0.30	3,300	80	2.4
	Nov.	81,850	260	0.30	5,000	90	1.8
Dec.	52,250	200	0.38	7,000	110	1.5	
	Total	1,390,145	5,260	0.37	97,834	1,862	1.9
Ilan Prefecture	Jan.	55,240	330	0.59	41,595	1,095	2.63
	Feb.	40,073	172	0.43	8,920	220	2.46
	Mar.	40,911	86	0.21	11,480	245	2.13
	Apr.	43,935	132	0.30	14,746	344	2.33
	May	71,771	230	0.32	17,697	340	1.92
	Jun.	33,350	137	0.41	6,650	126	1.89
	Jul.	11,350	33	0.29	6,286	151	2.40
	Aug.	1,000	3	0.30	1,480	30	2.02
	Sep.	6,670	23	0.35	2,950	62	2.10
	Oct.	31,000	200	0.64	3,125	260	8.32
	Nov.	61,200	320	0.52	12,000	530	4.41
	Dec.	60,570	400	0.66	16,000	712	4.45
		Total	457,071	2,066	0.43	142,929	4,115

討 論

對鴨病毒性肝炎之防治，用耐過鴨血清具有良效，已由Levine⁴⁾，白坂等⁷⁾所指摘，本病耐過鴨之血中抗體，自第14日能達 $\log 1.25 \sim 4.75$ 並持續至120日。一般在本省肉鴨均於10週齡前後即供為屠宰食用，該期血中抗體價均在 $\log 3.25 \sim 5.0$ 之間，此種含有高力價之中和抗體，不難控制本病之發生乃不容置疑之事實。

又接種含有 $\log 3.0$ 以上高力價中和抗體之小鴨，其抗體迅即出現血中，並能持續 14 日，然後逐漸下降，至 21 日後消失殆盡，為有效防禦具有日齡感受性不同之本病，能抑制富有高度感受性之 18 日齡內之感染，與白坂所指摘者尚能吻合。

為收集耐過鴨血清，須赴疫區詳細調查鴨羣之動態，雖然是疫區養鴨密集地帶，流行病毒並不一定能感染所有鴨場，因此採集對象限於在 3 週齡內，死亡率曾達 10% 以上者。在臺灣除本病新流行之外，尚有流行性感冒之發生，有常在化流行之家禽霍亂 (Pasteurellosis) 等之猖獗，因此所收集之耐過鴨血清，每批應測定中和抗體價，以免疏漏，尤其得自非疫區者更甚。

本病耐過鴨血清對未感染羣經實施緊急防治試驗，選擇 6 鴨羣，分注射組 11,100 隻，對照未注射組 2,880 隻，結果注射組之死亡率在 0.1—1.0%，平均 0.38%，對照未注射組是 2.2—13%，平均 4.41%，注射組之死亡率比對照組約低 1/10，注射組之成績較佳。

對已感染之 5 羣小鴨，經接種耐過鴨血清後，注射組 4,700 隻，死亡率僅 0.1—1.9%，平均 0.91%。未注射對照組之 1,770 隻，曾發生死亡率達 8.6—60%，平均 20%。注射組之死亡率僅為對照組之 1/20。注射組之成績甚優。

由於上述耐過鴨血清效力奇佳，故自 60 年 9 月起，在高雄縣，61 年元月起在宜蘭縣分別實施本病防治試驗，計自 60 年 9 月起至 61 年 12 月，在高雄、宜蘭兩縣共接種 2,087,979 隻。其他縣市亦相繼應用，因為此一龐大應用數目，曾拯救無數小鴨生命，同時對本省鴨病毒性肝炎防疫史上，留下輝煌業績。

但經筆者等調查，本病已污染全省各地，耐過鴨血清無非乃一時權宜之計，因耐過鴨血清畢竟取之有限，因此必須開發如 Hwang-Jen^{2,3)}, Rinaldi⁶⁾, Thamm⁸⁾, Toth⁹⁾, Asplin¹⁾ 等倡導之活毒疫苗之應用，因此筆者等現正在開發雞胚胎滅毒毒株及鴨腎細胞馴化毒，預期研製疫苗，同時對疫苗能採取省便之接種方式，如飲水、點鼻，或噴霧等方法，求取良好之免疫，並要求符合本省條件之預防接種計畫，對小鴨，種鴨求其兩全之預防接種效果，能有效控制本病之發生，以期杜絕後患。

結 論

(1) 在疫區所飼養之小鴨，經感染本病耐過之後，自第 7 日開始中和抗體慢慢上昇，至第 14 日達 $\log 1.25$ 至 4.75，30 日後高達 2.5—5.0 之間，該中和抗體能持續 120 日以上，在 60 日齡前後屠宰所得之血清，其中和抗體價均在 $\log 3.25 \sim 5.0$ ，可供為本病緊急防治之用。

(2) 屠宰場所收集之血液，經處理後，每隻平均能獲得約 20ml 之血清量。

(3) 被動注射耐過鴨血清 ($\log 3.0$ 以上之中和抗體價) 後之小鴨，在血中迅即出現抗體，並能持續至 14—20 日。

(4) 對未感染小鴨 6 羣，分注射組 11,100 隻，對照未注射組 2,880 隻注射組之平均死亡率 0.38%，對照未注射組即 4.41%，對照組死亡率高出 10 倍。

(5) 對已感染之 5 羣小鴨，使用耐過鴨血清，注射組 4,700 隻，死亡率僅 0.1—1.9%，平均 0.91%，未注射對照組有 1,770 隻，死亡率高達 8.6—60%，平均 20%，高出注射組有 20 倍之多。

(6) 從 60 年 9 月至 61 年 12 月止，在高雄、宜蘭兩縣，共接種 2,087,979 隻，其中斃死 13,303 隻，斃死率 0.63%。

本論文要旨曾於 61 年度臺灣省畜牧獸醫學會年會上提出報告。

誌 謝

本研究承蒙農復會撥助經費又承高雄縣家畜疾病防治所劉所長添源、蘇技士宗讓、蔣技士文珍等全所人員及宜蘭縣家畜疾病防治所全體工作人員之鼎力推動防治工作得以完成，謹以誌謝。

參考文獻

1. Asplin, F. D., and McLauchlain, J.D. : Duck virus hepatitis. *Vet. Rec.* 66, 456~458 1954
2. Hwang, J. : Chicken embryo—lethal strain of Duck hepatitis virus. *Avian Dis.* 9 417~422 1965
3. Hwang, J. : Active Immunization Against Duck hepatitis virus, *Vet. Res.* Vol. 33. No. 12. 2539~2544 1972
4. Levine, P. P. : Duck virus hepatitis, in Biester, *Disease of Poultry* 6th ed., 725~731 1972
5. 呂榮修；謝快樂、李永林、林再春、蘇宗讓；在臺灣所發生鴨病毒性肝炎之研究，家畜疾病研究計畫研究成果總報告17—36 1972
6. Rinaldi, A., Mandelli, G., Cervio, G., and Valeri, A. : Immunization of the Duck against viral hepatitis, *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* 24, 663~665 1970
7. 白坂昭治、玉崎幸ニ、久池井忠男、佐澤弘士：傳染性アヒル肝炎ウイルス中和抗體の持續とヒナへの移行について，日獸會誌1.20 No. 3 115—117 1967
8. Thamm, H., Ihlenburg, H., & Marwitz, T. : Virus hepatitis of ducks—virological diagnosis and control, *Mh. Vet. Med.* 22, 973~977 1967
9. To'th B., Czovek, L., and Markovits, P. : Role of active Immunization of breeding stock with attenuated virus in the control of Virus hepatitis of ducks *Magy, Allatorv. Lap* 21, 208~210 1966

Emergent Control of Duck Virus Hepatitis with Recovered Ducks' Sera in Taiwan

By Y. S. Lu, Y. L. Lee, Happy K. Shieh, T. C. Lin,
C. S. Chen, S. S. Chen

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

1. The neutralizing antibody titer of recovered ducklings started to raise gradually from the 7th day postinfection, and reached the titer of log 1.25 to 4.75 at the 14th day. It stayed at the level of log 2.5 to 5.0 30 days later and lasted till 120 days. The sera collected from 60—day—old slaughtered ducks had the titer of log 3.25—5.0, and could be used for emergency control of the disease.
2. About 20 ml of antiserum could be collected from each slaughtered duck.
3. The ducklings inoculated passively with recovered ducks' sera (with VN antibody level over log 3.0) could rapidly possess antibody and keep it for 14~20 days.
4. In six uncontaminated farms, 11,110 susceptible ducklings were inoculated with sera from recovered ducks and 2,880 ducklings served as uninoculated controls. The mortality of the control group (4.41%) was ten folds higher than that of inoculated group (0.38%).
5. In five DHV—contaminated farms, the mortality of 4,700 inoculated ducklings was only

0.1—1.9% (0.91% in average), while that of 1,770 uninoculated controls was 8.6—60%. The mortality of the inoculated group was much lower (20 times) than that of uninoculated control.

6. Ducklings (2,087,979 in total) raised both in Kaohsiung and Ilan prefectures were inoculated with the specific antisera since September 1971—December 1972. Among them, 13,303 heads were dead and the mortality was 0.63%.