

猪丹毒菌苗對小白鼠與猪免疫性之關係

吳義興 賴俊雄 張天桂 呂清泉

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

猪丹毒活菌苗在國內之使用歷史已很久，但是由於水劑活菌苗不易保存而死菌苗之免疫效力很低，為改進此種缺點世界各國曾有各種改良製劑之研究，本所於1964年有林再春等⁽¹⁾之猪丹毒菌苗冷凍乾燥之研究，並經作者於1972年推出乾燥猪丹毒活菌苗成品，正式供應國內各界使用。唯有關該種菌苗活菌數應多少才能具有充份之免疫效力，其免疫時間多久，抗體昇降之情形等資料均很少，為此使人對現行該種菌苗之效力檢定——以小白鼠免疫菌苗14天後，再以耐過猪丹毒菌強毒株之攻擊與否作為判定之依據——發生懷疑，尤其近年來抗生素及磺胺劑藥品之廣泛使用，控制本病已非難事之下，更需明瞭猪丹毒活菌苗之製品有否推廣使用之價值及依據。

試驗材料與方法

- 一、乾燥猪丹毒活菌苗：本所菌苗股所保存之猪丹毒菌 Acriflavin 耐性弱毒株經以 PH7.8 之普通液體培養基增菌培養30小時後，再培養於含 1% 健馬血清 PH7.8 之普通液體培養基，經24小時之培養後添加 Acriflavin 及作培養菌之純粹檢查。檢查結果陰性（即無雜菌）者以低溫高速遠心機每分鐘16,000轉集菌，集得之菌液先作菌數計算測其含菌濃度，再依以調整菌數，使在添加等量媒劑後之菌數為每 ml 在100~500億之間，依其預定製造之劑量而定，使用之冷凍乾燥媒劑為10%脫脂奶粉及 5% 酵母素。菌液添加媒劑後分裝於玻璃瓶，每瓶2ml，先以低溫（-50°C）凍結後再放入冷凍乾燥機，乾燥後再經抽真空及封蓋後而成品。
- 二、菌數之計算：菌液或乾燥成品添加磷酸飽和液溶解之菌液，以普通液體培養基依十進位法稀釋後，各取1ml 放於平板培養皿，每皿並添加1ml 之健馬血清，把 PH7.8 之普通寒天培養基放於 50~55°C 之水浴使溶融後分別倒入平板培養皿中，每皿約 15ml，在未凝固前搖動使培養液與皿中之菌液及血清混合均勻，待凝固後再放於 37°C 之培養恆溫器中經72小時後計算其發育之菌落，每組至少需培養五皿而取其平均值為菌數，每批瓶裝之菌苗計算至少必需算五瓶，取其平均值為該批菌苗之菌數。每次之操作均置血清對照及培養基對照各一組。
- 三、試驗動物：小白鼠：本所無病原動物股生產之健康小白鼠，體重13~15公克。小猪：使用本所無病原動物股所生產之小猪，體重15到20公斤，每隻小猪於試驗前兩週均先以本所製造之兔化猪瘧疫苗免疫。
- 四、攻擊用猪丹毒菌：為本所保存之攻擊用強毒猪丹毒菌三角捕株，培養於 PH7.8 之普通液體培養基經30小時，其毒力以13到15公克之健康小白鼠腹腔注射0.1毫升時其毒力約為 10°MLD。
- 五、抗體測定用抗原：以本所保存之 Acriflavin 耐性弱毒株猪丹毒菌經培養集菌後加入 0.0015% 之 Thymol 後，調節濃度為 McFarland 第二管，並添加0.001%之 Acriflavin 以著色。

試 驗 結 果

乾燥豬丹毒菌 Acriflavin 耐性弱毒株依上述菌苗製造方法培養及集菌，調整並添加媒劑製造成乾燥豬丹毒活菌苗共製十批，每批均於冷凍乾燥前之分裝後任取五瓶（每瓶 2 毫升）及冷凍乾燥後任選 5 瓶每瓶添加 2 毫升之磷酸飽和緩衝液溶解，各別稀釋然後培養作菌數計算，以測定冷凍乾燥過程對活菌之影響，作為以後製造乾燥前調整活菌數濃度之標準，其結果如表一。

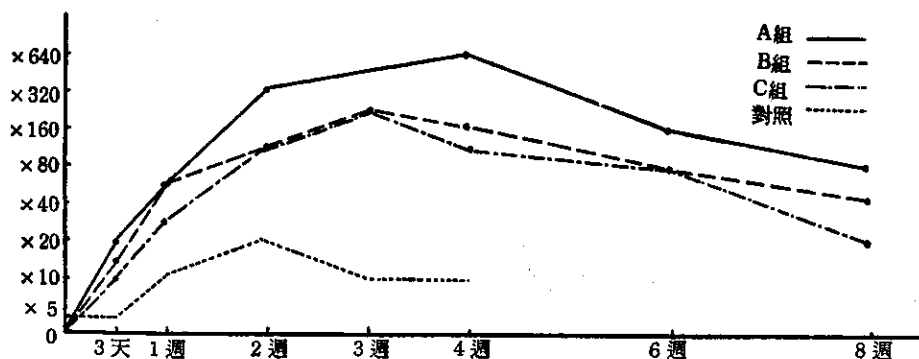
由表一、觀之，乾燥豬丹毒活菌苗冷凍乾燥前之菌數通常為冷凍乾燥後活菌數之 6 到 7 倍，此次試驗製造十批之代數平均為 6.7 倍，其中比數最少為第 1 批為 4.54 倍，最高為第 4 批達 9.61 倍之高，為確保菌苗成品能在預期菌數以上之可靠性以符合活菌苗之檢定標準（10 劑量裝以 2 毫升磷酸飽和液稀釋後，每毫升需含活菌數 1×10^8 以上），冷凍乾燥前之活菌數調整為預計活菌數之十倍最為恰當，故 10 劑量裝乾燥後應為 10×10^8 ，50 劑量裝應為 50×10^8 。

把製成之乾燥豬丹毒活菌苗以磷酸緩衝液稀釋後依其每毫升所含豬丹毒菌活菌數伍仟萬、壹仟萬、伍佰萬、壹佰萬、拾萬等分為 ABCDE 五組，每組皮下接種小白鼠各十隻，每隻 0.1 毫升，並置十隻不免疫為對照組。各免疫組於免疫後先經過 14 天之安全觀察，於均無任何之不良之反應及變化後，各組及對照組均於免疫後第 14 天以豬丹毒菌強毒三角埔株攻擊之，每隻小白鼠攻擊以豬丹毒強毒三角埔株於普通液體培養基（PH7.8）之 24 小時培養液壹萬倍稀釋液 0.1 毫升（約合 100MLD），而後每日觀察小白鼠之攻擊反應，經過 14 天其結果如表二。

乾燥豬丹毒活菌苗對小白鼠之免疫性依此次試驗觀之，其活菌數每毫升在伍佰萬以上即可具有合乎現行檢定標準 80% 之耐過率的能力，而其活菌數每毫升在壹仟萬以上則可有百分之百的耐過率，活菌數每毫升能在伍仟萬以上時，則免疫之小白鼠經攻擊以強毒豬丹毒菌後可完全無反應而健存。

製成之乾燥豬丹毒菌苗以磷酸緩衝液溶解並稀釋為每 ml 含活菌數壹仟萬、壹佰萬及拾萬三組，每組免疫接種小豬 2 頭，每頭皮下注射各 1 毫升，並留一頭不接種免疫作為對照，各頭小豬於免疫接種前及免疫後第 3 天、第 1 週、第 2 週、第 3 週、第 4 週及第 6 週、第 8 週各採血一次分離血清，然後以含 Acriflavin 著色之 Thymol 處理抗原與稀釋之血清作試管凝集反應以測定血清中凝集抗體之昇降情形，其測定結果如表三。

由上表觀之乾燥豬丹毒菌苗免疫豬其凝集抗體約在免疫後第 3 週左右時昇到最高峰，而後即開始緩緩下降，活菌數每毫升拾萬組與壹佰萬組之間其對小豬所產生之凝集抗體並無很大的差異，但與每毫升壹仟萬組比較，則可看出後者凝集抗體產生能顯然優於前二者，不但凝集抗體產生快而高，其抗體之消失下降亦較緩，於免疫後第 8 週仍然有 $\times 80$ 之凝集抗體價。其昇降曲線如圖一。



圖一 豬丹毒菌苗免疫小豬之抗體昇降曲線。

註：曲線 4 週前為平均之抗體，第 6 及 8 週為單一之抗體價。

上述免疫豬中於免疫後第 4 週選取凝集抗體價為 $\times 640 \times 160$ 及 $\times 40$ 3 隻與對照豬同時以豬丹毒強毒三角埔架在 PH7.8 普通液體培養液 30 小時培養之菌液攻擊，每隻皮下注射 2 毫升，然後觀察 2 週。結果對照豬重反應發病而瀕於斃死，免疫豬除抗體價 40 倍豬在第 4、5 天輕度發病外，均無任何反應而健存。

討 論

乾燥豬丹毒菌苗之製造必需能合於現行之檢定標準，才能成品供應獸醫界之使用，依此成品之豬丹毒菌苗在加入所附稀釋液後每 1 毫升必需含有 1 億個以上之活菌，即每劑量（2 毫升）必需有 2 億以上之活菌，依此次之試驗，冷凍乾燥前之活菌數平均約為乾燥後之 6、7 倍，最低時只 4、5 倍，最高則可達 9.61 倍，此種活菌數之減少與差異可能由於機器性能與計算上之人為差異所致，但為使每批成品之品質均能優良合乎所求，吾人仍應把乾燥前之活菌數調節為預定乾燥後活菌數之 10 倍，例如 50 劑量裝而言以 2 毫升菌液乾燥，則乾燥前每毫升必需含 500 億以上之活菌。

乾燥豬丹毒菌苗之活菌數每毫升在 500 萬以上即可免疫小白鼠使之經攻擊以強毒菌株後仍有 80% 以上之免疫耐力，但如果要使小白鼠獲得完全之免疫即每隻免疫過之小白鼠經攻擊後之 2 週均無任何反應而健存那就需要每毫升含 5,000 萬個以上之活菌。

乾燥豬丹毒菌苗對於豬之免疫性，其凝集抗體價之測定，此次雖採用 Dennis Sikes 等⁽⁵⁾ 所用之抗原即 0.0015% Thymol 處理濃度為 McFarland 此溫計 No. 2 之菌液，但本次試驗時另加入 0.001% 之 Acriflavin 以著色，結果使用效果更為理想。小豬之免疫依菌苗稀釋後每毫升含的活菌數分為三組，各組的凝集抗體之產生均很迅速，於免疫後第 1 週抗體即普遍上升，持續到約第 3 週達最高峰，而第 4 週以後即開始下降。菌數 10 萬個組在第 4 週有 $\times 40$ 以上之抗體，而凝集抗有 $\times 40$ 時經攻擊後只輕度發病而耐過，顯示已具有免疫效力。此組之免疫效果與菌數壹仟萬組相較，則後者顯然不但免疫抗體上升得快而高且經免疫第 4 週後抗體之下降亦較緩，免疫後第 8 週仍有 $\times 80$ 之凝集抗體價，預計在免疫後第 15 週左右才會降到 $\times 20$ 以下。可見活菌數愈多其免疫有效期則愈長。

本次抗體調查試驗用小豬全部使用本所無病原動物股生產者，以此種豬試驗影響因子較少，如自然抗體較低，但也因此使人考慮到試驗結果會因此與臨床上使用時之免疫抗體昇降情形有差異，更因來源有限故此次調查的小豬頭數似嫌太小，只能作為初步抗體調查之資料，有在臨床上作進一步的調查其免疫後抗體昇降情形的必要。

結 論

乾燥豬丹毒菌苗乾燥前之活菌數必需為預計乾燥後活菌數之 10 倍以上才能得到可靠之活菌數。豬丹毒菌苗活菌數每毫升在 500 萬以上即可免疫小白鼠使其在攻擊後有 80% 以上之耐過率。活菌數每毫升在 10 萬以上即可免疫小豬耐過強毒菌之攻擊，故以現行豬丹毒菌苗效力檢定標準，對小白鼠如具有 80% 以上免疫效力而合格當亦可免疫小豬而使其不受豬丹毒菌之侵擾，但對豬而言，其免疫有效期間顯然與菌苗之活菌數成正比例，每毫升含壹仟萬個活菌時，預計免疫有效期間約有 3~4 個月。

表一、乾燥豬丹毒菌苗冷凍乾燥前後之活菌數之此

| 菌苗批號 每ml菌數 | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 | No. 9 | No. 10 |
|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 乾 燥 前 | 1.0×10^{10} | 1.0×10^{10} | 1.5×10^{10} | 2.5×10^{10} | 2.5×10^{10} | 1.6×10^{10} | 1.0×10^{10} | 1.0×10^{10} | 2.5×10^{10} |
| 乾 燥 後 | 3.2×10^9 | 1.6×10^9 | 2.1×10^9 | 2.6×10^9 | 3.0×10^9 | 2.7×10^9 | 2.0×10^9 | 1.5×10^9 | 4.1×10^9 | 6.3×10^9 |
| 乾 燥 前 後 之 比 | 4.54 | 6.25 | 7.14 | 9.61 | 8.33 | 5.92 | 5.0 | 6.67 | 6.09 | 7.94 |

表二、猪丹毒菌苗活菌數而對小白鼠之免疫性

| 組別 | A組 | B組 | C組 | D組 | E組 | 對照 |
|--------|------|------|-----|-----|-----|----|
| 攻擊結果 | | | | | | |
| 重反應而斃死 | 0 | 0 | 1 | 3 | 8 | 10 |
| 輕反應耐過 | 0 | 2 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| 健康無反應 | 10 | 8 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| 耐過率 | 100% | 100% | 90% | 70% | 20% | 0% |

(A組：5,000萬。B組：1,000萬。C組：500萬。D組：100萬。E組：10萬。爲每毫升之菌苗活菌數。)

表三、小豬免疫猪丹毒菌苗後之抗體升降情形

| 組別 | 時間 | | | | | | | |
|------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 免疫前 | 免疫3天 | 免疫1週 | 免疫2週 | 免疫3週 | 免疫4週 | 免疫6週 | 免疫8週 |
| A組 菌數 1,000 萬 | ×5 <×5 | ×20 | ×40 | ×320 | ×320 | ×640 | ×160 | ×80 |
| B組 菌數 100 萬 | ×5 <×5 | ×10 | ×80 | ×80 | ×160 | ×160 | ×80 | ×40 |
| C組 菌數 10 萬 | <×5 ×5 | ×10 | ×40 | ×160 | ×320 | ×160 | ×80 | × |
| D (對照) 組 | ×5 | ×5 | ×10 | ×20 | ×10 | ×10 | (攻擊) | |

誌 謝

本報告之完成得行政院國家科學委員會之補助，特此致謝。

參考資料

1. 林再春、謝竹茂、周懋森、楊揚輝：猪丹毒菌冷凍乾燥之研究臺灣省家畜衛生試驗所報告第二期P. 9~30 (1964)
2. 瀨戶健次等：アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌の研究——マウスにおける關節炎發生能と豚における免疫原性との關係日本獸醫學雜誌第33卷第4號 P. 161~170 (1971)
3. 近藤正一等：猪丹毒性菌 Vaccine に關する研究 日本獸醫學雜誌 Vol. 14 No. 3 (1935)
4. Kuramasu, S. et al: Study on freeze-drying of swine erysipelic living Vaccine. Zbl. Vet. Med. 10B, 362~397 (1960)
5. Dennis, Sikes & T. J. Tumlin: Further studies on the erysipelothrix insidiosus tube agglutination test. Vet. Rec. Vol. 28 July 1967, p1177
6. Sikes, Dennis, Neher., George M., and Doyles Lop.: swine erysipelas. 1. A discussion of experimentary induced disease. JAVMA 128, (March 15, 1965) : 277~281

Study on the Immunogenicity of Attenuated Vaccine of Swine Erysipelas between Mice and Pigs

Wu Yi—Shing

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

According to the results of ten batches of lyophilized swine erysipelas live vaccine, it was noted that the living bacteria number before lyophilizing is 6.7 times (4.5 to 9.6 times) of that lyophilized. In order to prepare a satisfactory vaccine, it is necessary to adjust the living bacteria number (before lyophilizing) to 10 times of that expected.

Five groups of mice (10 of each group) were subcutaneously inoculated with 0.1 ml dilution of lyophilized vaccine titered 5×10^7 /ml, 10^7 /ml, 5×10^6 /ml, 10^6 /ml, and 10^5 /ml, respectively. Two weeks after vaccination, all the mice were challenged with virulent strain of the swine erysipelas bacteria. Eighty per cent of the mice vaccinated with vaccine titered 5×10^6 /ml survived of the challenge, while 100% of the mice vaccinated with vaccine titered 5×10^7 /ml showed no clinical signs and survived.

Using agglutination test, antibody could be detected in the vaccinated piglets one week post—vaccination, and, the antibody level reached 40x or more when the vaccine titered 10^7 /ml was used. The antibody titer remained at 80x eight weeks post—vaccination.

Four weeks after vaccination, piglets with agglutination antibody level of 40x, 160x, and 640x, respectively together with unvaccinated control were challenged with virulent erysipelas bacteria. The challenged control showed severe clinical signs, piglets with antibody level 40x got sick slightly, while the other groups (titer 160x and 640x) had no clinical signs at all.

In conclusion, the mice can be used for the bioassay of the erysipelas vaccine. The vaccine, which is effective in protecting mice from challenge is also effective in protecting swine. The effective protecting antibody level was maintained in pigs for only 3—4 months when the vaccine titered 10^7 /ml was used.