

臺灣猪麥可菌病(菌質病)之研究

II 麥可菌肺炎抗體調查

蘇杰夫¹ 鄭建盛¹ 陳守仕¹

林再春² 劉正義³

摘 要

應用 Micro-Complement fixation test 以測定臺北、雲林、高雄、屏東等縣及臺中市轄內豬場豬隻的 *M. hyopneumoniae* 抗體，於 1,020 例受檢豬血清中，共測出 131 例具有 *M. hyopneumoniae* 的抗體；若就豬齡而別，則陽性率最高者為母猪 43.3% (166/383)，次為仔豬 24.9% (58/233)，肉豬為 21.5% (87/404)。

另就 40 例呈肺炎內眼病變豬隻的血清中，測出 14 例具有本病的抗體，且 11 例分離出 *M. hyopneumoniae* 病原體。

本試驗證實臺灣豬隻已普遍感染了麥可菌肺炎 (*Mycoplasmal pneumoniae*) 而應用補體結合反應，以診斷本病具有實用價值。

緒 言

麥可菌肺炎是豬之一種慢性流行病。1965年 Mare & Switzer⁽¹⁾、Goodwin⁽²⁾ 等證明本病病原體為 *M. hyopneumoniae* (*M. suis*)，隨後激發了很多學者對本病研究的興趣。Bett 等 (1955)⁽³⁾，Young (1955)⁽⁴⁾，藤倉 (1969)⁽⁵⁾，Huhu (1970)⁽⁶⁾ 曾指出豬隻罹患本病，在經濟上將遭受重大之損失。本病之診斷可應用血清學診斷法。Roberts (1968)⁽⁷⁾，Boulanger & L'Ecuyer (1968)⁽⁸⁾，Takatori 等 (1968)⁽⁹⁾ Goodwin 等 (1969)⁽¹⁰⁾ 及 Hodges & Betts (1969)⁽¹¹⁾ 已證明應用補體結合反應法可測出豬血清中 *M. hyopneumoniae* 的抗體。Slavik & Switzer (1972)⁽¹²⁾ 更進一步改良補體結合反應技術，以微量補體結合法仍可測出豬隻是否感染本病。

在臺灣劉等 (1972)⁽¹³⁾ 陳等 (1975)⁽¹⁴⁾ 曾就病理學檢查法，進行本病的調查，曾發現豬隻有高到 63.9—67.4% 的陽性率，顯示臺灣豬隻罹患本病之嚴重性。筆者等 (1977)⁽¹⁵⁾ 亦曾從罹患慢性呼吸病仔豬肺材分離出 *Mycoplasma*，經生長抑制 (Growth inhibition; GI) 及代謝抑制 (Metabolic inhibition; MI) 試驗，鑑定為 *M. hyopneumoniae* 與 *M. hyorhinis*，並研製補體結合抗原。為明瞭臺灣豬羣確實感染本病情形，以及檢討自製之抗原在補體結合反應對本病診斷上之實用價值，乃進行本項試驗。

材料與方法

一、供試菌株：

1. 標準菌株：*M. hyopneumoniae* strain 11 (ATCC 25617)，係從美國菌種收集中心 (The American Type Culture Collection; ATCC) 引進。

抽印自中華民國獸醫學會雜誌第四卷第二期

1. 臺灣省家畜衛生試驗所
2. 農復會畜牧生產組
3. 省立屏東農專

2. 臺灣分離株：*M. hyopneumoniae*，經人工感染試驗可使豬呈典型之肺炎病變⁽³⁾。

二、培養基：

係在 Eagle's Minimum Essential Medium (GIBCO, F-12) 中加入 20% SPF 豬血清，2.5% 新鮮酵母抽出液，0.5% Lactalbumin hydrolysate (Difco) 及 30% 牛心浸出液。並以 1N 的氫氧化鉀調整 pH 至 7.4。

三、受檢豬血清及病材：

由臺北、雲林、高雄、屏東等縣及臺中市轄內養豬場，採取 383 頭 1 歲以上母猪，233 頭 2~5 週齡仔豬及 404 頭 2~4 月齡肥育肉豬之血液，經分離出血清，以冷藏輸送箱送抵本所供 *M. hyopneumoniae* 抗體測定。另由屏東、高雄及雲林縣從患病豬隻（包括其他病因引起之呼吸器病）蒐集肺材及其血清 40 例進行病原分離，其分離與鑑定方法如前報所示⁽³⁾。

四、補體結合抗原的製備：

如前一報告的方法製作⁽³⁾。係菌株經上述培養基大量增殖培養後，以 15,000 rpm，30 分鐘之高速離心沉澱菌體，再用 Veronal buffer 依同法離心洗滌三次，將其濃縮至原培養液的 1/100，再經以 20W 之超音波處理 15 分鐘，以使菌體破碎，次以 1ml 分裝於小試管，置於 -20°C，保存備用。

五、補體結合抗原之力價測定 (Box titration)

將製成抗原經解凍後，依 2 倍稀釋法將其由 4 倍開始稀釋至 512 倍，再置於 100°C 定溫水槽行 10 分鐘的熱處理，以除去非特異性因子；另將陽性血清依同法稀釋之，並經 56°C，30 分鐘的非動化；然後分別把不同稀釋倍數之抗原以 0.025ml 縱列注入 Tray-U 型的 8 個孔內，然後把不同稀釋倍數之陽性血清也以 0.025 ml 橫排注入 8 個孔內，再把 0.05ml 2 單位的補體分別注入各孔內，經混合後，置於 4°C 一夜，翌日再入 0.025 ml 的感作綿羊血液，於 37°C 定溫水槽感作 30 分鐘，判定其溶血抑制抗體力價。

六、補體結合反應試驗：

仿 Laboratory Branch Complement-Fixation Method (LBCF 法) 的方法進行⁽²⁰⁾。即先把受檢血清以 2 倍稀釋法，從 1:10 開始稀釋至 1:80 之後，經 56°C，30 分鐘非動化，然後把不同稀釋倍數的血清以 0.025 ml 分別注入盤孔內，隨即加入經上述方法測定過之 4 單位的抗原 0.025 ml。再依 Slavik & Switzer (1972)⁽¹⁶⁾ 之方法把結乾凍燥之補體 (Difco) 用 8 週齡之 SPF 健康小豬血清溶解之，經力價測定後稀釋成 2 單位之稀釋補體，將其 0.05 ml 分別加入注有受檢血清，抗原的孔內，充分混合，置於 4°C 感作一夜，翌日取出，再加入 0.025 ml 的感作綿羊血球，經 37°C，30 分鐘感作後判定。

結 果

一、製成的補體結合抗原的力價：

製成的抗原經方格式測定 (Box titration)，(如照片一所示)，於陽性血清稀釋 32 倍時呈溶血抑制現象，其 4 單位抗原價 (即 1:8) 時，陽性血清終末價乃為 1:32；而 4 單位抗原價 (1:8) 時，陽性血清終末價乃為 1:32，故進入本試驗時，得把此批製成抗原稀釋成 1:8 (因各批次製成的抗原其力價各異，故試前皆須測定一次，再行決定應當使用的抗原稀釋倍數)。

二、麥菌肺炎抗體於地域上分佈情形：

臺北等五縣市 1,020 頭受檢豬血清中，測得 311 頭 (佔 30.4%) 呈補體結合陽性反應，即血清 5 倍稀釋階有 50% 以上抑制溶血者 (如表一所示)，而抗體價以介於 1:10—1:20 之間者最多，而 $\geq 1:80$ 者較低，就縣市別，以高雄縣之陽性率最高，為 42.0%，屏東縣最低，為 23.0%，

又以 Slavik & Switzer⁽¹⁶⁾ CF 法測定，知仍有部份豬隻血清中保有 Procomplement，於血清低倍稀釋時出現溶血現象（如照片二所示）。

表一 臺灣豬麥可菌肺炎補體結合抗測定成績

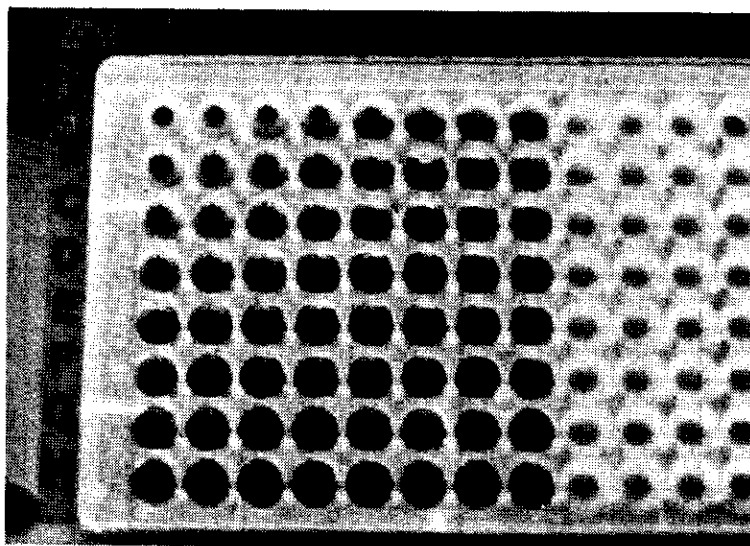
縣市別	檢查頭數	補體結合抗體陽性頭數					百分率(%)
		10×	20×	40×	≥80×	合計	
屏東縣	200	13	14	11	8	46	23.0
高雄縣	283	18	23	37	41	11	42.0
雲林縣	232	26	28	5	3	62	26.7
臺北縣	201	16	21	12	8	57	28.4
臺中市	104	9	11	5	2	27	26.0
合計	1020	82	97	70	62	311	30.4

三、麥可菌肺炎抗體於不同豬齡之分佈情形

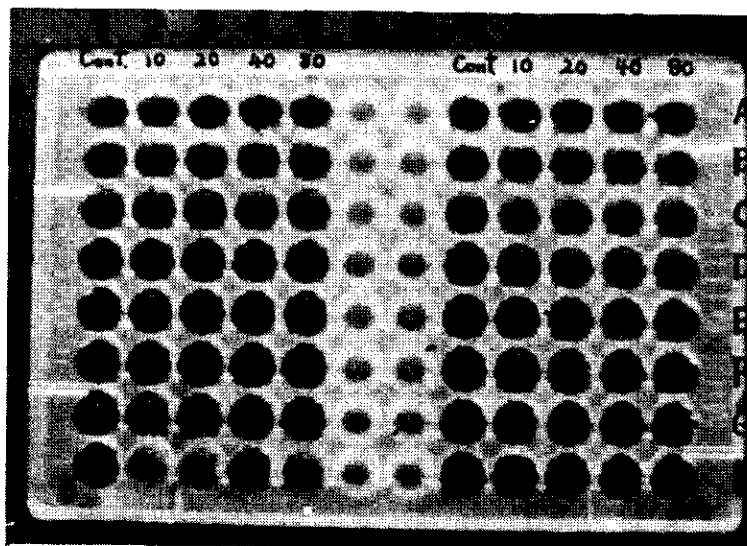
就豬齡類別，其抗體分佈情形如表二所示。以母畜的陽性率較高，為 43.3%，次為仔猪 24.9%，肉豬 21.5%。

表二 麥可菌肺炎抗體於不同豬齡之發生情形

豬齡	縣市別	受檢頭數	補體結合抗體陽性頭數					百分率(%)
			10×	20×	40×	≥80×	合計	
母豬 1歲以上	臺北縣	40	2	4	9	6	21	52.5
	雲林縣	20	1	0	5	3	9	45.0
	高雄縣	283	18	23	37	41	119	47.0
	屏東縣	40	2	3	5	7	17	42.5
合計		383	23	30	56	57	166	43.3
肥育肉豬 2—4月齡	臺北縣	93	10	7	1	1	19	20.4
	雲林縣	107	13	12	0	0	25	23.4
	高雄縣	100	7	6	3	0	16	16.0
	臺中縣	104	9	13	2	3	27	26.0
合計		404	39	38	6	4	87	21.5
仔猪 2—5週齡	臺北縣	68	4	10	2	1	17	25.0
	雲林縣	105	12	16	0	0	28	26.7
	屏東縣	60	4	5	3	1	13	21.7
合計		233	20	31	5	2	58	24.9



圖一 *M. hyopneumoniae* 補體結合抗原之 box-titration：縱列為抗原稀釋列（1：4～1：512），橫排為陽性血清稀釋列（1：4～1：512）。於陽性血清32倍（即1單位）時，（D）呈阻止溶血反應，其8倍（即4單位）時，抗原陽性終末價為1：32（1單位之抗原）（4），故1：8為4單位的抗原價。進行補體結合試驗時，即將此抗原稀釋成1：8使用之。



圖二：受檢血清之 *M. hyopneumoniae* 補體結合反應：（H），（B'），（C'）陽性反應，其餘皆為陰性。（B'）例之血清仍有 Procomplement，故1：20時仍有溶血現象。

四、病畜之肺炎肉眼病變、CF 抗體及病原體三者間的關係：

由屏東、高雄及雲林縣轄內就 40 例具有肺炎病變之肺材（原病巢部份與健康部之界限明顯呈肺樣變化者），及其血清，進行病原分離及 *M. hyopneumoniae* 抗體測定，以瞭解病原、病理變化及抗體間之關係。於 40 例病畜之血清中，僅 14 例測出 *M. hyopneumoniae* 抗體，而此 14 例陽性患者之肺材中，分離出 *M. hyopneumoniae* 病原體者有 11 例；而血清呈陰性反應之病畜肺材，皆未能分離出病原體。由於本項試驗，旨在針對 *M. hyopneumoniae* 病原體之分離，故未究明其他可能引起類似肺炎病變之病原菌的分離。

討 論

由臺北等五縣市轄內豬場採取血清樣本共 1,020 例，以 Micro-Complement Fixation test 進行 *M. hyopneumoniae* 抗體的測定，得知其陽性頭數為 311 例（約 30.4%）；與劉 (1972)⁽²⁾、陳 (1975)⁽¹⁾ 就病理學方法檢驗屠豬肺炎成績 63.9~67.4% 相差頗大，但該等所檢驗對象為有肺炎病變之屠宰肉豬，非一般的豬羣。Hodges & Betts (1969)⁽¹⁰⁾ 曾就屠豬 93 例以補體結合反應測定，僅檢出 36 例 (38.7%) 具有 *M. hyopneumoniae* 的抗體；但若由不同豬羣所測定者，其陽性率為 37~90%。據藤倉 (1969)⁽⁴⁾ 對日本豬隻調查情形，羣飼發生率高達 50.5~68%，飼養頭數在 100 頭以下者為 27.1~33.3%。筆者等此次檢驗之豬羣大都為一般農戶，其飼養頭數大都在 100 頭以下，由此可見陽性率較低。就豬齡而言，*M. hyopneumoniae* 之補體結合抗體之檢出率也不同，此次試驗中，以母畜之檢出率最高，為 43.3%，仔豬及肥育豬較低。據 Switzer (1975)⁽¹⁸⁾ 報告，豬齡的差異會影響體結合抗體之檢出率，6~18 月齡範圍之豬隻其檢出率為 38~60%，此範圍外的檢出率則較低。筆者等此次所檢母畜豬齡大都界於此範圍之內，相較之下，在此範圍外之肥育肉豬及 6 月齡以下之仔豬，其檢出率較母畜者為低。又由本次試驗成績可以同意母畜乃本病之重要污染源的看法。此乃 Switzer & Preston (1974)⁽¹⁷⁾ 之所以應用補體結合反應來摘出罹患本病之種畜，以為對本病之控制而能得到有效結果的理由。

豬血清中含有 Procomplement，它可增強天竺鼠之補體的溶血效力，這些豬血清的 Procomplement activity 曾被歸因於所含第三補體 (C_3) 成份較高，故在補體結合反應上往往測不出抗體。故 Boulanger & L'Ecuyer (1970)⁽⁷⁾、Takatori (1968)⁽¹⁹⁾ 等改良補體結合反應技術，以 1% 仔牛 (3~8 月齡) 血清稀液來稀釋補體，可解決此不利因子。Slavik & Switzer (1972)⁽¹⁶⁾ 更以 4~8 週齡仔豬血清稀釋補體，也得到良好成效。筆者等此次即仿其法進行本項試驗，始測出豬隻有 *M. hyopneumoniae* 之補體結合抗體，但有部份豬隻血清於 1:20 稀釋倍時仍存有 Procomplement，是否會因此影響檢出成績，尚待探討。

本次試驗大致可由補體結合反應陽性患者肺材中分離出 *M. hyopneumoniae*，而於陰性反應患者肺材中，却未分離出本菌。這可能是感染其他細菌而引起的支氣管性肺炎，而並非麥可菌引起之肺炎。因此筆者來日仍擬就部份補體結合反應陽性豬隻，進行剖檢及病原分離之追試，並探討如何去除豬血清中含有的 Procomplement，促進補體結合反應的效果，以評判補體結合反應對本病之實用價值。

又補體結合反應法，在操作上較一般血清學方法複雜。因此 Lam & Switzer (1971)⁽¹³⁾ 改以 Sodium Lauryl Sulfate 處理抗原並鞣酸 (Tannic acid) 處理豬血球感作，製成間接血球凝集反應法 (IHA) 之抗原。Holmgren (1970)⁽¹¹⁾ 也用蟻醛 (Formaldehyde) 固定豬血球後再與超音波處理的抗原感作製成 IHA 抗原。二者經試後，皆得很好的結果。因其方法簡單，去不必顧慮豬血清中 Procomplement 的干擾，故筆者將繼續試驗 IHA 法，以求得簡易確實的血清學診斷法，而供將來在田間之廣泛應用。

誌 謝

本試驗承蒙農復會之經費補助，畜牧生產組鍾組長博，殷切指導與鼓勵。臺北縣、雲林縣、高雄縣、屏東縣及臺中縣防治所協助採樣，使本試驗順利完成，僅申謝忱。

參 考 文 獻

1. 陳清、陳松、林地發、張永富、林榮培、李全、李永林、傅和美、李金乾、邱朝齊、陳守仕、林再春。1975。在臺灣豬流行性肺炎之研究。臺灣畜牧獸醫學會會報，23：16—30。
2. 劉正義、張照夫、鄭清木。1972。屠宰豬隻肺炎之研究。臺灣畜牧獸醫學會會報 20：16—31。
3. 蘇杰夫、林地發、林榮福、邱朝齊、林再春、劉正義、林茂勇。1977。臺灣豬麥可菌病之研究：I. 麥可菌種之分離同定及補體結合抗原之研製。中華民國獸學會雜誌，3：1—8。
4. 藤倉孝夫，1969。家畜試年報，P. 60~65，猪の流行性肺炎調査試験研究の概要。日本家畜衛生試驗場。
5. BETTS, A. O., P. WHITTLESTONE., W. I. B. BEVERIDG., J. H. TAYLOR and R. C. CAMPBELL, 1955. Virus pneumonia in pigs: Further investigations on the effect of the disease upon the growth rate and efficiency of food utilization. Vet. Rec. 67: 661—665.
6. BOULANGER, P. and C. L'ECUYER, 1968. Enzootic pneumonia of pigs: Complement-fixation tests for the detection of mycoplasma antibodies in the serum of immunized rabbits and infected swine. Can. J. Comp. Med. Vet. Sic. 32: 547—554.
7. BOULANGER, P. and C. L'ECUYER, 1970. Complement-fixation test for the diagnosis of porcine enzootic pneumonia. Vet. Rec. 86: 448.
8. GOODWIN, R. F. W., A. P. POMEROY. and P. WHITTLESTONE, 1965. Production of enzootic pneumonia in pig with a mycoplasma. Vet. Rec. 77: 1247—1249.
9. GOODWIN, R. F. W., R. G. HODGSON., P. WHITTLESTONE and R. L. WOODHMAS, 1969. Immunity in experimentally induced enzootic pneumonia of pigs. J. Hyg. 67: 193—208.
10. HODGES, R. T., and A. O. BETTS, 1969. Complement-fixation tests in the diagnosis of enzootic pneumonia of pigs. Vet. Rec. 85: 452—458.
11. HOLMGREN, N., 1974. An indirect haem-agglutination test for detection of antibodies against *M. hyopneumoniae* using formalinized tanned swine erythrocytes. Res. Vet. Sic. 16: 341—346.
12. HUHN, R. G., 1970. Swine enzootic pneumonia: Incidence and effect on rate of body weight gain. Am. J. Vet. Res. 31: 1097.
13. LAM, K. M. and W. P. SWITZER. 1971. Mycoplasmal pneumonia of swine: Development of an indirect hemagglutination test. Am. J. Vet. Res. 32: 1731—1736.
14. MARE, C. J. and W. P. SWITZER, 1965. Mycoplasma hyopneumoniae new species: A causative agent of virus pig pneumonia. Vet. Med/Small Anim. Clin. 60: 841—846.
15. ROBERTS, D. H., 1968. Serological diagnosis of mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. Vet. Rec. 82: 362.
16. SLAVIK, M. F. and W. P. SWITZER, 1972. Development of a micro-titration com-

- plement-fixation test for diagnosis of mycoplasmal swine pneumonia. Iowa State J. Res. 47 : 117—128.
17. SWITZER, W. P. and W. S. PRESTON, 1974. Application of the complement-fixation test to the control of mycoplasma pneumonia in swine. Abstr. 11th Ann. Meeting Am. Vet. Med. Assoc.
 18. SWITZER, W. P. and R. F. ROSS, 1975. Mycoplasmal disease p. 741—766, Dune, H. Wand A. D. Leman, Disease of swine, 4th ed. U. S. A.
 19. Takatori, I., R. G. HUHNS and W. P. SWITZER, 1968. Demonstration of complement-fixation antibody against *M. hyopneumoniae* in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia. Nat. Inst. An. Hith. Qtr. 8 : 195—203.
 20. U. S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 1974. Standardized diagnostic complement-fixation method and adaptation to micro test. Public Health Monograph. 40 : 31—34.
 21. YOUNG, G. A., 1956. Measures to obtain and maintain a healthy herd of livestock. J. Am. Soc. Farm Managers and Rural Appraisers 20 : 63.

Studies on Swine Mycoplasmosis in Taiwan

II. A survey on complement-fixation antibody of mycoplasmal pneumonia

J. F. SU¹, J. S. JEN¹, S. S. CHEN¹,
T. C. LIN² and C. I. LIU³

Summary

Of 1,020 pig serum samples collected randomly from several hog farms in Taipei Hsian, Yunlin Hsian, Kaohsiung Hsian, Pingtung Hsian and Taichung City, 311 cases were positive in antibody against *M. hyopneumoniae* by microtitration complement-fixation test. The antibody-positive rate were shown 43.34% (166/383) in sows, 24.89% (58/233) in piglets, and 21.53% (87/404) in fatten-pigs.

In addition, among 40 pigs with lesions of pneumonia found grossly, 14 were positive in serum antibody detection, in which 11 strains of *M. hyopneumoniae* were isolated from the pneumonic portions of the lungs

This experiment indicates that mycoplasmal pneumonia is a common disease in pigs in Taiwan, and micro-complement-fixation test is an available method for the diagnosis of the disease.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
2. The Joint Commission on Rural Reconstruction
3. Taiwan Provincial Pingtung Institute of Agriculture