

# 從豬隻分離所得巴斯德桿菌之型別鑑定與 試製抗原對家兔及豬隻之免疫

陳 清<sup>(1)\*</sup> 澤田拓土<sup>(2)</sup>

(1) 台灣省家畜衛生試驗所

(2) 日本農林水產省動物醫藥品檢查所

**摘要** 由供試豬鼻腔內病材分離所得之 9 株巴氏桿菌，使用間接血球凝集反應 (Indirect hemagglutination test, IHA test) 及瓊脂免疫沈降反應 (Agar gel precipitation test, AGP test) 作型別及菌體抗原鑑定之結果，得知 Type A 有 5 株，Type D 有 4 株，而菌體抗原則均為第 3 型。以不同型別菌株，試製抗原免疫家兔及豬隻之結果，家兔之 IHA 抗體價，因型別及免疫個體之不同而有所差異，自 1:32 至 1:2,048 不等，而免疫豬所產生之抗體價偏低，但經攻擊而耐過者則呈明顯上昇。

**關鍵詞：**巴氏德桿菌、間接血球凝集反應、瓊脂免疫沈降反應、血清型、豬

## 緒 言

豬萎縮性鼻炎 (Swine Atrophic Rhinitis, 簡稱 AR) 於 1830 年首由德國 Franque 提出報告以來，迄今已有 160 多年之歷史，至於引起病害之致病因子，在早期雖有各種不同之學說，如遺傳因素及營養障害等，但至 1956 年美國 Switzer<sup>(15)</sup> 首次報告博德氏支氣管敗血症桿菌 (*Bordetella bronchiseptica*, *B. b.*) 為 AR 之病原，1971 年日本 Shimizu et al.,<sup>(14)</sup> 以無特定病原豬 (Hysterectomy produced colostrum deprived pigs 簡稱 HPCD 豬) 人工感染 *B. bronchiseptica* 究明本菌可引起豬萎縮性鼻炎，Switzer<sup>(16)</sup> 亦認為 *B. bronchiseptica* 為本病之主要病原。在台灣陳等<sup>(4)</sup> 在台北縣某養豬場，發現本病之集團發生病例，並分離出純粹之 *B. bronchiseptica* 之菌株，可見本病在台灣早已擴散為集團性之發生。然而，在 1980 年 de Jong 等<sup>(10)</sup> 發現 *Pasteurella multocida* (*P. m.*) type D 菌株產生之壞死性毒素可引起 AR 之病害，遂引起研究者，養豬業者及生物製劑研究開發之極大矚目，但 Sawata 等<sup>(13)</sup>

在日本由分離所得之巴氏桿菌 type D 毒素產生株，經試驗研究之結果，認為本菌可能不是 AR 之原發病原。1989 年陳等<sup>(5)</sup> 以博德氏支氣管敗血症桿菌 (*B. bronchiseptica* phase 1, 12-1 株) 及巴氏桿菌 (*P. multocida* type D ATCC 12948 株)，分別培養所得之菌液，感染無博德氏菌及巴氏桿菌抗體母豬所生 4 日齡仔豬，得知二種不同菌株之培養液，單獨多次重複感染仔豬，均可引發不同程度之鼻甲介骨萎縮病變，而其菌液混合感染者，所引發之病變顯較單獨感染者為重。由於巴氏桿菌所扮演引發豬萎縮性鼻炎之角色，日漸受到重視，因此筆者在本試驗中，擬對由豬隻分離所得之 9 株巴氏桿菌作型別上之鑑定，以明瞭其分佈情況，同時以不同菌型 (A 型及 D 型) 試製之抗原免疫家兔及豬隻，以供研發生物製劑之重要參考。

## 材料與方法

### 一、供試材料

1. 鑑定用未知型別菌株：係由日本北海道某豬場

\*抽印本索取作者

本文原載於台灣畜牧獸醫學會會報，65：239-246 (1995)  
台灣省家畜衛生試驗所

由鼻病材分離所得之菌株 9 株。

2. 供試已知型別菌株：係由日本農林水產省動物醫藥品檢查所提供。

Type A-p-3827 (由牛分離所得)

Type B-M-1404 (由野牛分離所得)

Type D-P-3881 (由牛分離所得)

Type E-Bunia II (由牛分離所得)

3. 供試已知菌株供菌苗製造及試驗用菌株

A'a-p.m-94 (3 : A) DNT -

D'a-p.m-61 (3 : D) DNT +

A'b-challenge strain (1 : A) 台灣株

D'b-ATCC p. m-12948 (11 : D pig origin)

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 65389)

4. 供試培養基：

Dextrose starch agar, Brain heart infusion agar, Brain heart infusion broth, 均為美製 Difco 產品。

5. 紅血球懸液：使用綿羊紅血球。

6. 微量滴盤 (Microtiter plate)：使用美製 Dynatech Laboratories Inc.

96 孔之 U 底之塑膠盤。

7. 家兔：為健康體重在 2.0~2.5 公斤者。

8. 中豬：體重 30~40 公斤未經細菌性菌苗免疫注射之健康三品種豬。

## 二、試驗方法：

1. 家兔免疫用抗原之調製：

將已知型別之種菌 type A. B. D 及 E 等供試菌株培養於 Dextrose starch agar 之培養皿平板上，在 37 °C 培養 18 小時，然後以 0.85 % 生理食鹽水將菌苔洗下，每一培養皿使用 1ml，作成濃厚菌液，並添加 0.3 % 福馬林，作為不活化處理。然後以 PBS 調整其濃度約  $3 \times 10^9$  organisms / ml，未加任何佐劑。

2. 家兔高免血清之製備：

上述各型別免疫用抗原以家兔為材料，基礎免疫皮下注射 1ml，10 日後依漸進遞增抗原量之方式，每週二次，靜脈注射抗原由 0.1 → 0.2 → 0.5 → 1.0 → 1.5 → 1.5 → 2.0 → 2.0 ml 之劑量各免疫二隻家兔，最後免疫後經一週採血測定抗體價後全放血，分離血清，添加 0.01 % Thimerosal 及 0.06 % Phenol 保存於 4 °C 冰箱中，供被檢菌株型別抗原鑑定之用。

3. 間接血球凝集反應 (Indirect Hemagglutination

Test, IHA test) 抗原之製備：

依 Sawada et al.,<sup>(12)</sup> 之方法，製作加熱抽出抗原 (Heat extract antigen)，即將已知型別種菌培養於葡萄糖澱粉平板培養基 (Dextrose starch agar, DSA, Difco) 在 37 °C 培養 18 小時，每一個培養皿加入 1ml 之 0.02 M 磷酸緩衝生理食鹽水 (Phosphate-buffered saline, PBS, PH 7.2)，將菌苔洗下，添加等量每 1 ml 含有 200 單位 hyaluronidase 之 PBS 溶液，其混合菌液置於 37 °C 感作二小時，時加搖動，以除去 hyaluronic acid，以免干擾試驗成績，然後置於 100 °C 加熱一小時，以平均值約  $7025 \times g$  離心 30 分鐘，輕取上清液，添加 0.1 % Sodium azide 保存於 4 °C 冰箱，供為間接血球凝集反應之抗原。

4. 抗原感作血球液之調製：

採取之脫纖綿羊血球液以 5~6 倍量之 0.85 % 生理食鹽水洗滌 6 次，再以 PBS 配成 10 % 紅血球懸液 (vol / vol)，另以 PBS 稀釋為 1 % 之 Glutaraldehyde 等量加入前述 10 % 紅血球液於 4 °C 輕攪拌 30~60 分鐘，視原先鮮紅之綿羊紅血球液轉變成磚紅色為止。然後以平均值  $314 \times g$  離心 10 分鐘，將沉澱之紅血球再以 PBS 離心洗滌三次，最後以含 0.1 % Sodium azide PBS 配成 10 % 懸液，此即為所謂 GA-SRBC，然後以 10 % GA-SRBC 加入等量之 2 倍系列稀釋之前述加熱抽出抗原液，混合後在 37 °C 溫水槽內感作一小時，時加振盪，再將此抗原感作血球液加入 2~3 倍量之 PBS 離心洗滌三次，最後以含 0.25 % Bovine serum albumin (BSA)，0.1 % Sodium azide 之 PBS 配成 0.5 % 血球懸液，(Vol / Vol)，此即為抗原感作血球液。而抗原濃度之適當與否係以 Box titration 加以測試，IHA 反應時使用 4 凝集單位為抗原。

5. 間接血球凝集反應 (IHA test)：

係使用微量 96 孔滴盤，免疫血清以 0.02 M PBS (PH 7.2) 含 0.25 % 牛血清蛋白 (BSA) 作 2 倍系列稀釋後各加入 25  $\mu$ l 於微量滴盤，然後再各加入 25  $\mu$ l 之 0.5 % 抗原感作血球液，置於室溫 1~2 小時，在血球未解離沉降前加以判讀 (一般為 30~50 分鐘即可測試判定)，並以陽性及陰性血清作為對照試驗。

6. 巴氏桿菌 type A 之鑑定方法：

除使用 IHA 試驗外，並參考 Carter 及 Rundell<sup>(9)</sup> 之方法，以金黃色葡萄球菌

*Staphylococcus aureus* 所產生玻尿酸酵素之影響，會影響劃線培養之被檢未知莢膜型別之巴氏桿菌靠近葡萄球菌培養發育之部位，明顯的發育變淡縮小，呈現此種現象者即可判定為 type A 之巴氏桿菌。

#### 7. 巴氏桿菌 type D 之鑑定方法：

本型別之鑑定和 type A 相同，除使用已知型別高免血清作 IHA 試驗，依 type A 之簡便玻尿酸酵素之發育影響試驗外，並參考 Carter 及 Subronto<sup>(8)</sup> 之方法，以 0.1% Acriflavine 0.5 ml 加入以 Brain heart infusion broth 在 37°C，18~24 小時培養之被檢巴氏桿菌之濃厚菌液 0.5 ml (由 3ml → 離心濃縮為 0.5 ml)，如果是 type D，即可於 5 分鐘內呈現濃厚叢毛狀之沈澱。

#### 8. 瓊脂擴散沈降反應用菌體抗原 (Somatic antigen) 之調製：

依 Heddleston et al.<sup>(11)</sup> 之方法，將供試之 9 株未知菌體抗原之巴氏桿菌培養於 DSA 平板培養基 18~24 小時之菌苔，以 8.5% 食鹽水 (含 0.3% 福馬林) 將菌苔洗下每一培養皿用 1 ml，然後置於高壓蒸氣滅菌器 121°C 加熱 1 小時，在平均值 7025 × g 將其離心 20 分鐘，輕取上清液，供為菌體抗原測定之用。

#### 9. 瓊脂擴散沈降試驗 (Agar gel diffusion precipitation test, AGP test)：

依 Heddleston et al.<sup>(11)</sup> 之方法，配製反應用瓊脂，其組成為 Special Agar Noble (Difco) 0.9%，NaCl 8.5%，Thimerosal 0.01% 於蒸餾水中，經加熱溶解滅菌消毒後，製成玻片平板鑑定用培養基，每片 5 ml 俟冷卻凝固後以特製打洞器打洞，作成外圍距 4 mm，中央間距 6 mm 之培養基，由已知菌體免疫血清來測定未知之被檢菌體抗原。

#### 10. 已知菌體血清型菌株高免血清之製備：

依以 SPF 中雞為材料，依 Heddleston 分類之菌體抗原血清型 No 1~16 各菌株之 DSA 培養菌液，每一培養皿加入 1 ml PBS 將菌苔洗下，添加 0.3% 福馬林不活化處理，經調整菌液為  $3 \times 10^9$  organisms/ml 濃度，加入等量之油質佐劑攪拌均勻後供為中雞免疫之用，每隻頸部皮下各注射 1 ml，每組注射三隻。三週後全放血測定其抗體價，選擇特異性抗體高作為瓊脂擴散試驗，供未知菌株菌體抗原鑑定之用。

#### 11. 試製免疫原對豬隻之免疫試驗：

將已知菌型之 ATCC 12948 (11:D)、Pm-61 (3:D) 及 Pm-94 (3:A)，培養所得菌液以油質佐劑調製而成之不活化菌苗，(含  $3 \times 10^9$  CFU/ml) 基礎免疫各皮下注射 2 ml，二週後各補強注射 3 ml，每組各使用 2 頭，另一頭為對照，共使用 7 頭中豬，補強注射後二週採血測定血清中之 IHA 抗體價，並以免疫抗原同株之活菌液各 2.5 ml (約  $2 \times 10^9$  CFU/ml 靜脈注射，以觀察其是否抵抗攻擊，並於攻擊後 2 週採血測試其抗體價。

## 結 果

### 一、由豬隻分離所得巴氏桿菌之型別鑑定成績

由供試 9 株巴氏桿菌製成間接血球凝集反應抗原感作血球液，以製備之已知 type A 及 D 莢膜型別高度免疫血清為材料，實施 IHA 試驗鑑定未知型別菌株抗原之結果，得知供試之 9 株中屬於 type A 者有 5 株，屬於 type D 者有 4 株。而以瓊脂免疫擴散試驗，以製備之已知菌體抗原高免血清 type 1-16 型作菌體抗原鑑定之結果，供試之 9 株被檢巴氏桿菌均屬於第 3 型。詳如表一所示成績。

### 二、不同型別巴氏桿菌抗原免疫家兔後其間接血球凝集反應之抗體成績：

由已知莢膜型別之巴氏桿菌 type A、B、D、及 E，製成之不活化免疫抗原注射家兔每組二頭，依試驗方法所述之劑量，遞增其抗原量，最後全放血測得之間接血球凝集反應之抗體價，自 1:32 至 1:2,048 不等，由其所得成績得知，不但型別間有所差異，即使同型菌株免疫之不同家兔，由於個體之差異，其抗體價亦有高低之別。詳如表二所示成績。

### 三、不同型別菌苗免疫豬間接血球凝集抗體價：

將已知之 type D 二株及 type A 一株製備之菌苗，中豬免疫前所採取之血清，作 IHA 抗體測定之結果，對 type A 及 type D 之抗體價均在 4 倍及 16 倍之間，而補強注射後之抗體價亦在 8 倍及 32 倍之間，並無明顯之上昇。經同型菌株活菌液靜脈注射攻擊後，每組各有一頭分別於第 5 天及第 6 天斃死。而輕反應耐過者於攻擊後 2 週採血測試其抗體價呈顯著之上昇，詳如表三所示成績。

表一：由豬隻分離所得巴氏桿菌之型別鑑定成績

Table 1: Results of serotype identification of *Pasteurella multocida* strains isolated from swine.

供試菌株編號 Strain No.	對不同型別血清之間接血球凝集價 IHA titer against type		菌體血清型 O-serotype*
	A	D	
	463	128	—
464	—	128	3
465	256	—	3
466	256	—	3
467	—	64	3
468	—	64	3
469	256	—	3
470	256	—	3
471	—	64	3
Positive Aa serum	512	—	+++
Control Da	—	128	+++

\* Detected by AGP test.

表二：不同莢膜型別巴氏桿菌抗原免疫之家兔，其間接血球凝集反應之抗體力價

Table 2: Results of IHA titer of rabbits immunized with various serotype immunogens of *Pasteurella multocida*.

家兔號碼 Rabbit No.	免疫原莢膜血清型 Immunogen serotype	抗體價 IHA titer	
		免疫前 Before immunization	免疫後 After immunization
1	A	< 8	256
2		< 8	512
3	B	< 8	256
4		< 8	256
5	D	< 8	128
6		< 8	128
7	E	< 8	512
8		< 8	2,048
9	Ab	< 8	64
10		< 8	32

表三：巴氏桿菌不同型別菌苗免疫豬之間接血球凝集反應抗體價

Table 3: Results of IHA titer of swine immunized with various serotype bacterins of *Pasteurella multocida*.

豬號碼 Pig No.	免疫原之型別 Serotype of immunogen (1)	間接血球凝集抗體價 IHA titer against serotype(2)		活菌液攻擊後之間接血球凝集抗體價 IHA titer at 2 weeks after challenge with life cell suspension(3)	
		A	D	A	D
1		4 / 8	16 / 16	< 8	1,024
2	Db	4 / 8	8 / 16	-	D5(4)
3		4 / 8	16 / 32	< 8	2,048
4	Da	4 / 8	16 / 16	-	D5
5		4 / 8	16 / 16	512	< 8
6	Aa	4 / 8	16 / 16	D6	-
7	control	4 / 16	8 / 16	< 8	8

(1) Dosage: Basic, 2 ml SC, booster 3 ml IM. at 3 weeks interval.

(2) Numbers represented the titers that were detected before vaccination / 2 weeks after booster vaccination.

(3) Challenge was done with 2.5 ml of life cell suspension contains  $2 \times 10^9$  CFU/ml IV. Challenge strain as same as immunogen strain, respectively.

(4) Dn: Dead cases, the number indicated till death day after challenge.

- : No sample collected.

## 討 論

豬萎縮性鼻炎之病原，雖博德氏菌扮演重要角色，然而自 de Jong et al, (10) 發現巴氏桿菌 D 型產毒菌株可引起鼻甲介骨萎縮病變以來，巴氏桿菌之重要性日漸加重，學者之研究亦頗積極。在國內吳等 (1, 2) 亦曾由罹患豬萎縮性鼻炎之豬場，分離出 A 型及 D 型菌株，並由實驗接種 D 型巴氏桿菌毒素引起豬萎縮性鼻炎之報告。在本研究中供試之 9 株巴氏桿菌，除以 Carter 及 Rundell (9) 之方法作 A 型菌之發育影響鑑定，Carter 及 Subronto (8) 之方法作 D 型之特殊叢毛狀沈澱之 D 型菌之鑑定外，並以製作之抗 A 型及抗 D 型菌之高免血清作間接血球凝集反應試驗，所得結果顯示 A 型菌及 D 型菌在豬場中分佈約略相同。惟菌體抗原以瓊脂擴散反應試驗之結果，由已知 1~16 型菌體抗血清做免疫反應確認供試之 9 株巴氏桿菌，均為第 3 型。國內周 (3) 由豬場現場斃死豬及屠宰場肺炎病變之材料所分離之巴氏桿菌 407 株中 A 型佔 76.7%，(312/407)，D 型佔 16.0

% (65/407)，顯示由肺炎病材所分離者以 A 型菌者較多，至於產毒之比例則以 D 型菌較高達 72.3% (47/65)，惟其菌體抗原並未加以探討。

在本研究中對於供試菌株之產毒性能未加以測試。而由對家兔之免疫成績得知，多次補強注射可產生良好之抗體價，由於菌型之不同及家兔之個體差而有所不同，詳已如表一所示成績。至於對豬隻之免疫試驗成績，其抗體價偏低，可能由於抗原含量較低有關，同時本菌苗之抗體產生能力似嫌偏低，陳等 (6, 7) 試製豬萎縮性鼻炎、巴氏桿菌及胸膜肺炎多價菌苗免疫之母豬，以簡便之免疫擴散試驗，雖初乳可測出抗 A 型菌及 D 型菌 1:4 ~ 1:32 不等之免疫抗體價，但免疫豬血清則未能以免疫擴散方法測出，可能與其力價及使用方法敏感度有關，惟耐過攻擊者其抗體價則呈明顯之上昇。

誌謝 本研究承蒙日本農林水產省動物醫藥品檢查所及同仁提供試驗材料與諸多協助，得能順利完成，謹致萬分之謝忱。

## 參考文獻

1. 吳兆奇、沈瑞鴻、劉正義·1992·從罹患豬萎縮性鼻炎豬場分離 A 及 D 型巴氏桿菌產毒菌株之鑑定。中華獸醫誌。18：145-150。
2. 吳兆奇、劉正義、許添桓、沈瑞鴻·1992·實驗接種 D 型巴氏桿菌毒素引致豬萎縮性鼻炎。中華獸醫誌。18：151-161。
3. 周濟眾·1994·敗血性巴氏桿菌 (*Pasteurella multocida*;) 與豬肺炎之相關性研究。台灣省畜牧獸醫學會會報。64：31-42。
4. 陳清、李全、林地發、陳忠松、邱朝齊、陳守仕、林再春·1974·豬萎縮性鼻炎集團發生例及分離病原菌 *Bordetella bronchiseptica* 之生物學性狀。台灣省畜牧獸醫學會會報。24：51-61。
5. 陳清、呂清泉、賴俊雄、張天桂、詹益波·1989·人工感染博德氏菌、巴氏桿菌及其混合感染引致之豬萎縮性鼻炎。中華獸醫誌。15：129-137。
6. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、詹益波、邱仕炎·1991·豬萎縮性鼻炎及胸膜肺炎多價菌苗之研製及對實驗動物之安全與效力。中華獸醫誌。17：159-167。
7. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、詹益波·1994·豬萎縮性鼻炎巴氏桿菌症及胸膜肺炎多價菌苗之研製與田間試驗。中華獸醫誌。20：327-337。
8. Carter, G. R. and P. Subronto. 1973. Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine *Am. J. Vet. Res.* 34 : 293-294.
9. Carter, G. R. and S. W. Rundell. 1975. Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.* 12 : 343.
10. De Jong, M. F., H. L. Oei and G. J. Tetenburg. 1980. AR-pathogenicity tests for *Pasteurella multocida* isolates, *Proc. Int. Pig Vet. Sci Congre* 211.
11. Heddleston, K. L, J. E, Gallagher and P. A. Rebers. 1972. Fowl cholera, gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species, *Avian Dis.* 16 : 925-936.
12. Sawada, T., R. B. Rimler and K. R. Rhoades, 1982. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. *J. Clin. Microbiol.* 752 - 756.
13. Sawata, A, T. Nakai, M. Tuji and K. Kume. 1984. Dermonecrotic activity of *Pasteurella multocida* strains *Jpn. J. Vet. Sci.* 46 : 141-148.
14. Shimizu, T., M. Nakagawa, S. Shibata and K. Suzuki 1971. Atrophic rhinitis produced by intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in hysterectomy produced colostrum deprived pigs. *Cornell Veterinarian* 61 : 696-705.
15. Switzer. W. P. 1956. Infectious atrophic rhinitis, V. Concept that serveral agents may cause turbinate atrophy. *Am. J. Vet. Res.* 17 : 487.
16. Leman, A. R, R. D. Glock, W. L. Mengeling. R. H. C. Penny, E. Scholl, and B. Straw. 1981. Bordetellosis ( Switzer. W. P. ). *Diseases of swine* 5th ed. Iowa state, pp.497-507.

## Serotyping of *Pasteurella multocida* Isolated from Swine and Immunization Trial in Rabbits and Swine.

Ching Chen<sup>(1)</sup> and Takuo Sawada<sup>(2)</sup>

(1) Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

(2) The National Veterinary Assay Laboratory, Tokyo.

**ABSTRACT** Indirect hemagglutination (IHA) test and agar gel precipitation (AGP) test was used to for serotyping and somatic antigen identification of nine strains of *Pasteurella multocida* isolated from nasal cavities of swine. Five strains of type A capsule antigen and four of type D were identified. All the somatic antigens are observed to belong to serotype 3. Immunogens prepared from various serotype of *Pasteurella multocida* strains were used to immunize rabbits and swine. IHA antibody titer of immunized rabbits ranged from 1 : 32 to 1 : 2,048 depending on the types and strains. The antibody titer for immunize swine were low. However, the IHA titer increased significantly in resistant swine after challenge.

**Key words:** *Pasteurella multocida*, Serotype, Indirect hemagglutination test, Swine, Agar gel precipitation test

---

\*Corresponding author

Reprinted from the Taiwan J Vet Med Anim Husbandry 65 : 239 - 246 (1995)  
Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.