

## 水禽雷氏桿菌症不活化多價菌苗之研發與應用

喻昭芳\*、黃金城、趙磐華

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

**摘要** 本研究的目的是為開發具保護力的水禽雷氏桿菌症 3 價不活化菌苗，以符合市場防疫需求。首先進行菌株的蒐集、選定與鑑定，完成蒐集共 21 種血清型菌株並製備高免血清，以利後續快速檢測鑑定田間流行型別，並初步選定近年流行第 1、2 及 6 血清型為未來研究菌苗株。接著著手菌苗最適生產條件建立，及各種免疫效力提昇試驗，由結果可知不同培養基與培養時間對最終菌苗效力影響不大，2 倍與 10 倍稀釋劑量對鴨隻保護效果不佳，多次菌苗效力試驗防禦指數成績皆可達多種不活化菌苗國家檢定標準。最後使用 ELISA 檢測鴨血清抗體方法建立，由預測趨勢線顯示，免疫 3 價菌苗後可引起鴨隻體內 3 型高抗體力價。

**關鍵詞：**水禽雷氏桿菌症，不活化菌苗，效力試驗，ELISA。

### 緒言

由 *Riemerella anatipestifer* (RA) 引起的水禽雷氏桿菌症為台灣重要的水禽傳染性疾病，鴨、鵝在 1~8 週齡對本病最具感受性，主要引起病禽敗血症、全身性漿膜炎、恢復禽隻生長遲緩及不合格屠體增加[5]，不良的飼養環境及其他疾病併發皆會造成本病的爆發，發病率由 5%~75%[4]，發病場常一再發病，且清除不易而重複發生，造成業者經濟損失[5]，故發展有效菌苗防疫為一必然趨勢。本菌之血清型別複雜，目前共有 21 種血清型[13]，除了第 5 與第 2、9 型間具微弱交叉反應外，其餘之間皆無交叉保護力，而造成預防上的困難[5]。最理想的方式是突破血清型別的限制，找出可產生保護力之致病或毒力因子來開發菌苗防疫[3]，但目前仍未有成果，所以現階段施打有效的涵蓋愈多血清型別的多價菌苗，應是最佳的防治方式與暫時解決的方法。

本次研究擬研製與開發本病症 3 價不活化菌苗，2007 年工作項目內容說明如下：首先進行菌株

的蒐集、選定與鑑定，接著著手於菌苗最適生產條件之建立，及各種免疫效力提昇試驗，最後則是使用 ELISA 檢測鴨血清抗體方法之建立。

### 材料與方法

#### 菌株的蒐集、選定與鑑定：

共蒐集 21 種不同血清型別菌株共 27 株，觀察培養於血液培養基[Blood agar plate(TSA + 5% 脫脂綿羊血),啟新]中菌落型態與細菌染色鏡檢，以及使用市售細菌生化鑑定套組(API20NE,Biomérieux)生化鑑定，鑑定後號碼為 1010004、0010004 或 0210004 判定為 RA 菌[10]，確認本菌後，加上脫脂奶粉(Skim milk,Difco)保護劑分別冷凍乾燥(Beta 1,Christ)保存之。之後參照劉之方法[5]，分別製備高免血清，以利後續檢測與鑑定田間流行型別。台灣分離株(截至 94 年止，由中央畜產會調查提供，尚無文獻發表)流行血清型依序為第 2、6 與第 1、10，因此初步選定第 1、2 與 6 血清型研發 3 價菌苗。

\*抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

兔高度免疫血清製備：菌株培養後溶入 PBS，離心洗菌後加入 0.3% 福馬林 (Formaldehyde sol.37%,Merck) 去活化，最終使用分光光度計 (CE2501,Cecil)調整至 OD<sub>525</sub> 為 0.2 懸浮液，間隔 3~4 日依次提升劑量 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0mL 免疫兔耳靜脈共 6 次，隔 6 日後犧牲取得血清。

菌苗菌株選定效力試驗：選擇第 2 血清型野外分離株共 4 株測試，分別培養於胰蛋白浸膏培養基 (Tryptic soy broth,Difco)中後加入 0.3%福馬林不活化，最終加上氫氧化鋁膠 (Aluminum hydroxide gel,Sigma)配製成 4 種單劑量約  $1 \times 10^{10}$ CFU 單價不活化菌苗，分別於第 1 及 2 週齡時免疫鴨隻，而在 4 週齡時分 3 階段濃度菌液攻毒，觀察 2 週內免疫與對照組死亡結果，分別以 Beherens-Karber 法計算兩組 LD<sub>50</sub>[1]，最後得到 4 種菌苗 LD<sub>50</sub> 防禦指數成績加以比較之。

### 菌苗最適生產條件試驗：

設定不同培養基、時間及方法培養菌株，作菌數計算(CFU)來取得何種條件可獲得最大細菌產量，以利未來菌苗上市量產時可有效降低成本。(1)液體與固體培養基培養量試驗：將第 2 血清型菌株培養於 BAP 及 TSB，分別作 CFU 計算，求得每 mL 培養基約可製得的菌量。(2)培養時間培養量試驗：將第 2 血清型菌株培養在 TSB 內 6、12、18 及 24 小時，後續程序同上。(3)靜置與震盪培養量試驗：將第 2 血清型菌株培養在 TSB 內靜置及震盪培養(震盪培養箱 S300R,Firstek)，後續程序同上。

### 各種免疫效力提昇試驗：

設定不同培養條件與不同調製方法製備各種菌苗，分別免疫鴨隻比較測試其效力。(1)液體與固體培養基效力試驗：將第 2 血清型菌株培養於 BAP 及 TSB，後續製備程序同上，製成兩種菌苗免疫鴨隻後攻毒(方法同上)，最後得到效力成績再加以比較。(2)培養時間效力試驗：將第 2 血清型菌株培養在 TSB 內 6 及 24 小時，後續製備與動物試驗程序同上。(3)劑量濃度效力試驗：配製完成的菌苗以 PBS 稀釋 2

倍與 10 倍，加上原液菌苗共 3 組，分別免疫鴨隻後攻毒，本組試驗攻毒方法異於上述 Beherens-Karber 方法，使用單濃度攻擊後，分別得到免疫與對照組之死亡率，並計算出防禦指數(對照組死亡率-試驗組死亡率)×100%/對照組死亡率[12、14]，測試其效力的差異。

### 使用 ELISA 檢測鴨血清抗體：

在血清學檢驗方面，常用的平板凝集試驗與瓊脂擴散試驗，二者皆可有效且快速的鑑定血清型別[2、7]，但對於血清抗體力價的分析則敏感性尚嫌不足[8]，參考與改良英國 Hatfield 等人[8、9、11]之方法，使用高敏感性與特異性的酵素免疫分析法(ELISA)檢測與分析鴨血清抗體力價，改善前提兩項血清試驗方法之不足。(1)抗原製備：培養第 1、2 及 6 血清型菌株，菌落刮下以 PBS 混勻後離心洗菌，最後以 Coating solution(15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、30mM NaHCO<sub>3</sub>，pH9.6)將 RA 菌調整濃度至 OD<sub>540</sub>=1.0，置入-20℃冰箱冷凍解凍 3 次，再將此菌液稀釋 8 倍後即為試驗用抗原。(2)血清樣本：包括不同日齡的清淨場、污染場與免疫 3 價菌苗後之鴨血清。(3)ELISA 方法：取專用平底 96 孔盤，每孔加入 100 μL 抗原液後於 4℃靜置，棄孔內液體並風乾，每孔加入 300 μL Washing buffer(0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.1M NaCl、0.1% Gelatin、0.05% Tween 80，pH7.0)清洗後風乾。血清樣本經 56℃水浴 30 分鐘非動化，稀釋至適當倍數，每孔加入 50 μL 血清後於 37℃感作，每孔再以 300 μL Washing buffer 浸洗後拋棄孔內液，每孔加入 50 μL 之 400 倍稀釋 Horseradish peroxidase 標示抗體 Goat-anti-duck IgG(KPL)，置於 37℃感作後以 Washing buffer 再次浸洗。於每孔加入 100 μL ABTS peroxidase substrate 呈色劑(KPL)，置於陰暗中作用 30 分鐘後加入 100 μL Stop solution(KPL)停止反應，並使用酵素免疫分析儀(ELISA reader,Multiscan,Thermo)以波長 405nm 測定其吸光值。(4)標準線性預測趨勢線製作：將不同濃度抗體血清(免疫後 1~15 週血清及兩家污染場血清共 26 支鴨血清樣本)，先 100 倍稀釋後(檢測 RA 1 和

2 抗體)再 2 倍連續稀釋測得 OD 值，檢測 RA 6 則先 1,600 倍稀釋再 2 倍連續稀釋，使用 Excel 電腦軟體繪出 3 個血清型連續稀釋曲線圖，找出所有樣本斜線最低通過點，即為 Cut off value，再分別對應出稀釋倍數(X 軸)與其 OD 值(Y 軸)後，再使用 Excel 繪出 3 個血清型預測趨勢斜線圖，由血清 OD 值套入趨勢線後可獲知該血清抗體力價，最後可算出免疫 3 價菌苗後血清抗體力價分佈。

## 結果

### 菌株的蒐集、選定與鑑定：

(1)免高度免疫血清製備：使用平板凝集試驗檢測自製 21 種血清型高免疫血清，力價介於 8 倍~64 倍間。(2)菌苗菌株選定效力試驗：第 2 血清型共 4 株效力測試結果詳如 Table 1，第 1、2 株菌苗防禦指數可達  $10^{1.5}$  及  $10^{0.88}$ ，第 3、4 株則並未測出。

Table 1 : Result of potency test of the same serotype four strains bacterins against *Riemerella anatipestifer* in ducklings.

Kinds of Bacterins	No. of Ducklings For Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions			LD <sub>50</sub>	Protection Index
		10x Condensed	Original	10x Diluted		
RA2-1						
Vaccinate	15	0(0/5)	100(5/5)	100(5/5)	LD <sub>50</sub> =1.4×10 <sup>10.5</sup>	PI=10 <sup>1.5</sup>
Non-immunized	6	0(0/2)	0(0/2)	50(1/2)	LD <sub>50</sub> =1.4×10 <sup>9.0</sup>	
RA2-2						
Vaccinate	15	0(0/5)	20(1/5)	100(5/5)	LD <sub>50</sub> =1.3×10 <sup>9.63</sup>	PI=10 <sup>0.88</sup>
Non-immunized	9	0(0/3)	0(0/3)	33.3(1/3)	LD <sub>50</sub> =1.3×10 <sup>8.75</sup>	
			10x Original	10x Diluted		
RA2-3						
Vaccinate	15	0(0/5)	20(1/5)	0(0/5)		
Non-immunized	8	0(0/3)	0(0/3)	0(0/2)		
RA2-4						
Vaccinate	15	0(0/5)	0(0/5)	60(3/5)	LD <sub>50</sub> =2×10 <sup>7.17</sup>	PI=10 <sup>-0.83</sup>
Non-immunized	5	0(0/2)	50(1/2)	100(1/1)	LD <sub>50</sub> =2×10 <sup>8.0</sup>	

**菌苗最適生產條件：**

(1)液體與固體培養基培養量試驗：兩者獲得菌量差異不大，約介於  $9 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$  CFU/mL，但固體培養基 BAP 在培養過程接菌與收菌時會增加污染機會，且成本價格較昂貴。(2)培養時間培養量試驗：分別培養於 6、12、18 及 24 小時可得約  $1.5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^{10}$  及  $1.5 \times 10^{10}$  CFU/mL 菌量，在 18~22 小時可得最大菌量。(3)靜置與震盪培養量試驗：靜置時完全不生長，小台(180rpm)與大台(120rpm)震盪培養箱內培養可得較佳菌量。

**各種免疫效力提昇試驗：**

(1)液體與固體培養基效力試驗。(2)培養時間效力試驗：兩項效力比較試驗結果詳如 Table 2，培養於 BAP 與 TSB 或是培養 6 及 24 小時所製得之菌苗免疫鴨隻後，皆可獲得防禦指數  $10^{1.28}$  以上。(3)劑量濃度效力試驗：效力結果詳如 Table 3，菌苗濃度 1 劑量、2 倍與 10 倍稀釋劑量的防禦指數分別為 70%、30%和 10%。

Table 2 : Result of potency test of *Riemerella anatipestifer* bacterins prepared from different culturing time and medium in ducklings.

Kinds of Bacterins	No. of Ducklings For Test	Survival Rate(%) after Challenge with 3 Level Concentrations of Bacterial Suspensions			LD <sub>50</sub>	Protection Index
		10x Condensed	Original	10x Diluted		
6h-BAPvac'	14	80(4/5)	80(4/5)	100(4/4)	LD <sub>50</sub> > $3 \times 10^{11}$	PI > $10^{1.78}$
6h-BAPvac'	14	40(2/5)	60(3/5)	100(4/4)	LD <sub>50</sub> = $3 \times 10^{10.5}$	PI = $10^{1.28}$
24h-BAPvac'	13	50(2/4)	80(1/5)	100(4/4)	LD <sub>50</sub> = $3 \times 10^{10.78}$	PI = $10^{1.56}$
24h-TSBvac'	14	80(4/5)	60(3/5)	100(4/4)	LD <sub>50</sub> > $3 \times 10^{11}$	PI > $10^{1.78}$
Non-immunized	18	0(0/6)	50(3/6)	33.3(2/6)	LD <sub>50</sub> = $3 \times 10^{9.22}$	

Table 3 : Result of potency test of three concentrations dosage bacterins against *Riemerella anatipestifer* in ducklings.

Kinds of Bacterins	No. of Ducklings For Test	Survival Rate(%) After Challenge	Protection Index
1 dosage	10	70(7/10)	70%
2x Diluted	10	30(3/10)	30%
10x Diluted	10	10(1/10)	10%
Non-immunized	10	0(0/10)	

### 使用 ELISA 檢測鴨血清抗體：

供作對照用的陰性血清，完全 RA 清淨場難尋，因此血清樣本數不足，僅來自本所動物用藥品檢定分所提供的鴨血清共 11 支，血清經 100 倍稀釋後對第 1、2 及 6 血清型抗原呈現低背景值(OD 值介於 0.110~0.175 ； 0.119~0.210 ； 0.150~0.274)，污染場與免疫菌苗後血清則呈高背景值，兩者有顯著的差異。

分別 coating RA 1、2 與 6 Ag 後，使用 ELISA 方法檢測不同濃度抗體血清(免疫後 1~15 週血清與兩家污染場 A 及 B farm 鴨血清)連續稀釋測得 OD 值，繪出連續稀釋曲線圖，3 個血清型曲線圖型類似，在此僅以 coating RA 1 Ag 圖表示，詳如 Fig.1，找出所有血清樣本斜線最低通過點，分別對應出稀釋倍數與其 OD 值後，再分別繪出 3 個血清型的預測趨勢斜線圖，以第 1 血清型斜線圖為代表，詳如 Fig.2，最後可由此 3 個趨勢線圖獲知免疫 3 價菌苗後血清抗體力價分佈，詳如 Fig.3。

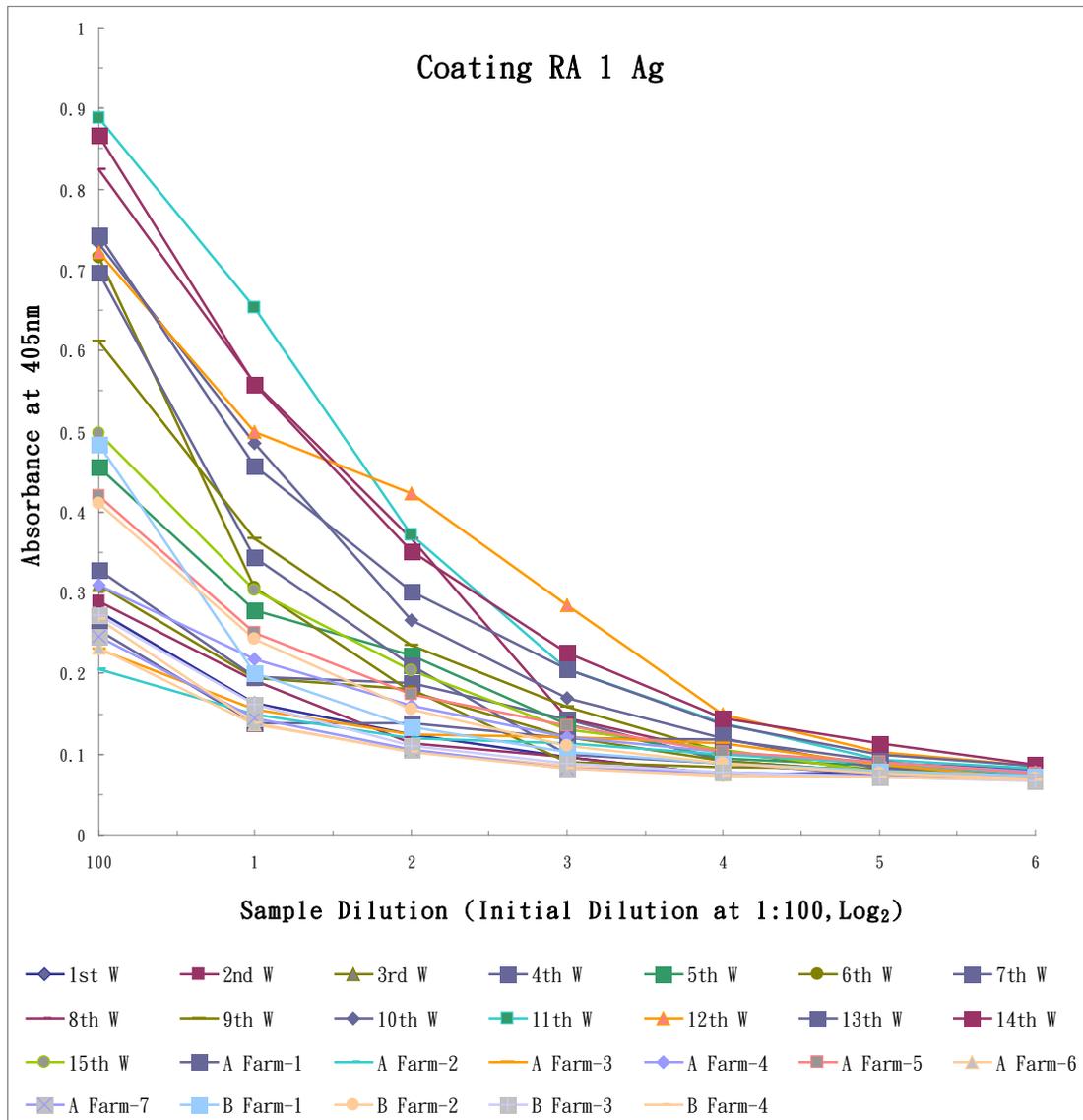


Fig.1 : Calculations of log<sub>2</sub> serum end point titers for twenty six ducks sera assayed in ELISA. The titer is calculated where the sample dilution curve intercepts the line representing the limit of detection of the assay.

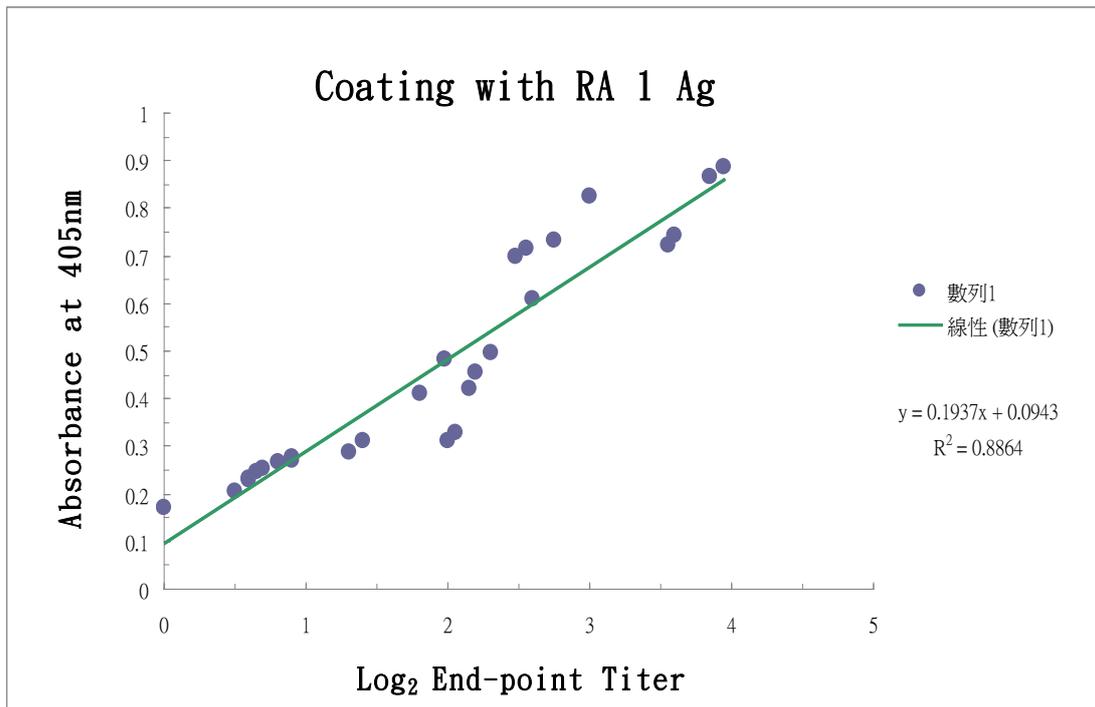


Fig.2 : Relationship between the absorbance of duck sera determined by ELISA, and the corresponding end-point titer. The derived prediction curve enables the end-point titer to be predicted from the absorbance measurement of duck sera in ELISA.

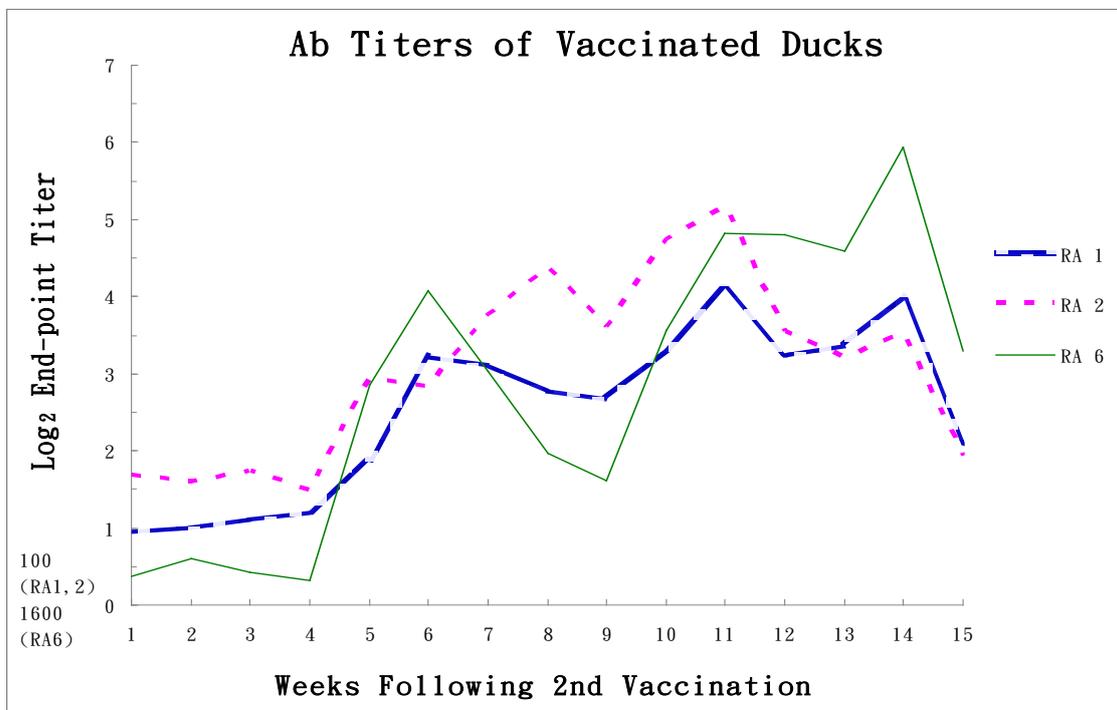


Fig.3 : The levels of serum antibodies to RA in ducks vaccinated with RA serotype 1、2 and 6 trivalent bacterins. Values were end point titers obtained from prediction curve.

## 討論

共蒐集 21 種不同血清型別菌株，經多項鑑定程序後可確認為本菌。之後分別製備免高度免疫血清，以利後續可快速檢測與鑑定田間流行型別。截至 94 年止由中央畜產會調查提供的台灣分離株流行血清型為第 2、6 與第 1、10，因此本次計畫選定第 1、2 與 6 血清型研發 3 價菌苗，但於 96 年 11 月本所第 759 次學術研討會疫學研究組發表調查報告結果，發現田間流行血清型別似乎改變成第 2、12 與第 1 的趨勢，原第 6 血清型則跌入前 3 名外[6]。因本菌之多變性，擬先行開發當初選定第 1、2 與 6 型 3 價菌苗，有了前提研發經驗後，將可參照各大學老師蒐集當年流行血清型別，再行製造供應防疫，可能為一種因應田間流行多變的方法。

至於菌苗菌株選定之效力比較，選擇第 2 血清型野外分離株共 4 株測試，第 1 株菌苗防禦指數可達  $10^{1.5}$ ，可得最佳保護效果，第 2 株為  $10^{0.88}$  尚可，第 3 與第 4 株雖其毒力強，但似乎其免疫原性與抗原性皆差，所以剔除不考慮。液體與固體培養基及不同培養時間效力比較試驗中，由結果可推論出培養於 BAP 與 TSB 或是培養 6 及 24 小時所製得之菌苗免疫鴨隻後，皆可獲得防禦指數  $10^{1.28}$  以上，其中兩組更大於  $10^{1.78}$  以上，已達多種不活化菌苗的國家動物用藥品檢驗標準（如 *E.coli* :  $10^{0.5}$  與 *A.pleuropneumoniae* :  $10^{1.0}$ ）[1]，似乎培養方式不同對效力成績並無顯著的差異。關於菌苗劑量濃度上，由效力比較試驗可知，2 倍與 10 倍稀釋免疫鴨隻後保護效果不佳，僅 30% 和 10%，所以不活化菌苗還是需要高濃度的菌量才能達到滿意的保護力。

免疫鴨隻菌苗後目前仍以攻毒方式測試菌苗的效力，文獻上使用單濃度菌液攻擊獲得免疫與對照組死亡率，之後再計算出防禦指數[(對照組死亡率-試驗組死亡率) × 100% / 對照組死亡率]為效力試驗結果，使用此種計算方法，倘若攻毒後免疫組死亡率為 0%，對照組死亡率不論低或高(0% 或 100%)，其防禦指數皆為 100%，似乎並無法呈現出正確的菌苗保護效果。為改善此一現象，效力試驗改使用 3 階段濃度菌液攻毒，再分別以 Behrens-Karber 法計算

與比較免疫與對照組的  $LD_{50}$  防禦指數，可得到更為精確的效力試驗成績。

利用 ELISA 檢測不同濃度抗體血清測得 OD 值，製作出 OD 值與抗體力價關係的預測趨勢線圖，再利用此趨勢線進而可由測定之 OD 值快速得知抗體力價，但蒐集之血清樣本數尚嫌不足，可能因此造成趨勢線之  $R^2$  值較低(數值愈接近 1.0 表愈可靠)，致影響了趨勢線之可靠性。由趨勢線顯示鴨隻免疫 3 價菌苗後之抗體消長，第 1 及 2 血清型免疫後抗體由 200~400 倍開始緩慢爬昇，於第 6 週至 800 倍，而第 6 血清型從 1,600 倍上升至第 6 週 25,600 倍，3 種血清型皆於第 11 週達到高峰後緩降。由此可知，免疫死菌菌苗後可引起鴨體內不低的抗體力價，至於菌苗的效力與血清抗體力價之相關性，是否力價的高低表示菌苗的保護力，則仍需再作更進一步的試驗佐證之。另外使用 ELISA 方法檢測不同血清型抗體，在 96 孔盤 Coating 上相對應的抗原為全菌抗原，不同血清型間之共同抗原部份並未排除，可能因此導致血清非特異性反應增加，找出個別血清型之特異性抗原作為 ELISA 用抗原應可改善之。

## 誌謝

本研究承蒙本所前製劑研究系系主任陳清博士不吝撥冗回所教導與協助，日本獸醫生命科學大學澤田拓士教授(Dr.Takuo Sawada)及泰國國家動物衛生試驗研究所細菌組主任 Pornpen Pathanasophon 博士蒞所指導與慨贈寶貴試驗材料，多項試驗得能順利完成，謹併誌萬分謝忱。

## 參考文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。動物用藥品檢驗標準(II)。2005。
2. 黃旭田、徐華山、莊啟增、蔡睦宗、陳文烈、洪信雄、張榮儒。屏東縣水禽傳染性漿膜炎之調查研究-關於病原分離、肉眼及組織病理學變化、血清凝集抗體分析調查。臺灣畜牧獸醫學會會報57:63-70，1991。
3. 黃培峻。 *Riemerella anatipestifer* 菌苗之研製。碩士論文，國立中興大學獸醫學研究所。2004。
4. 黃國安。鴨疫黎氏桿菌(*Riemerella anatipestifer*) 毒力相關蛋白基因vapD1 之次單位疫苗及DNA疫苗建構及對鴨隻免疫保護效果。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
5. 劉育宗。鴨 *Riemerella anatipestifer* 感染症之研究。碩士論文，國立台灣大學獸醫學研究所。2002。
6. 陳燕萍。台灣水禽雷氏桿菌血清型別之調查。行政院農業委員會家畜衛生試驗所學術研討會專訊2：26-29，2008。
7. Brogden, K.A., K.R. Rhoades, and R.B. Rimler. Serologic types and physiologic characteristics of 46 avian *Pasteurella anatipestifer* cultures. Avian Diseases. 26:891-896, 1982.
8. Hatfield, R.M., B.A. Morris and R.R. Henry. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of humoral antibody to *Pasteurella anatipestifer*. Avian Pathology. 16:123-140, 1987.
9. Hatfield, R.M., B.A. Morris. Influence of the route of infection of *Pasteurella anatipestifer* on the clinical and immune responses of White Pekin ducks. Research in Veterinary Science. 44:208-214, 1988.
10. Hinz, K.H., M. Ryll, B. Kohler and G. Glunder. Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar micro-organisms from various hosts. Avian Pathology. 27:33-42, 1998.
11. Lobbedey, L. and B. Schlatterer. Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccines and in serum of their offspring. Journal of Veterinary Medicine Series B. 50:81-85, 2003.
12. Pathanasophon, P., T. Sawada, T. Pramoolsinsap and T. Tanticharoenyos. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrate in ducks. Avian Pathology. 25:705-719, 1996.
13. Pathanasophon, P., P. Phuektes, T. Tanticharoenyos, W. Narongsak and T. Sawada. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. Avian Pathology. 31:267-270, 2002.
14. Sandhu, T.S. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatipestifer* vaccine in White Pekin ducklings: laboratory and field trials. Avian Pathology. 20:423-432, 1991.

## Development and Application of a Trivalent Inactivated Bacterin against *Riemerella anatipestifer* Infection

Chao-Fang Yu\*, Chin-Cheng Huang, Parn-Hwa Chao

*Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan*

**Abstract** The purpose of this study is to develop a trivalent inactivated bacterin against *Riemerella anatipestifer* (RA) infection. At first, we have finished the collection, selection and identification of 21 serotypes of RA strains. The hyperimmunized sera against 21 serotypes of strains were also produced by using the rabbit models and they will be used for fast identification of field strains in the future. The strains including serotypes 1, 2 and 6 were preliminarily selected to develop a trivalent bacterin.

We have also established various culture methods, and performed the comparison of different results to determine the best conditions for the induction of immune efficacy. The results showed that there is no significantly difference on potency tests of the trivalent bacterin prepared from different culture time or media. The 1/2 and 1/10 dosages could not provide enough protection against challenge. Several potency tests have shown that the most protection indexes of the bacterin have reached the national standards of animal drug inspection.

The development of an ELISA kit for detecting duck serum antibodies against RA antigens has shown sufficient sensitivity and susceptibility.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer* infection, inactivated bacterin, potency test, ELISA

