

敗血性巴氏桿菌類毒素疫苗之研製

吳義興 陳素貞 張惟茗 蕭終融

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 由 14 株敗血性巴氏桿菌 D 群分離株，選出 2 株可產生天竺鼠皮膚壞死性毒素者，經培養於含 5 % 代血清之腦心浸液培養基 20 小時，經離心所收集之菌體以超音波打擊抽取其毒素而製成粗製毒素，經測定其蛋白質含量後，調整其濃度為每 ml 含 1 mg 之蛋白質液，其對天竺鼠皮膚壞死反應力價為 32 倍，即約 3 μ g 即可引起反應。粗製毒素經管柱分離後產生之純化毒素，約 6 ng 即可引起天竺鼠皮膚壞死反應。

粗製毒素以甲醛不活化後，加入不活化巴氏桿菌及鋁膠佐劑製成類毒素疫苗，試製成之類毒素疫苗免疫小白鼠後，再以活菌攻擊，結果其防禦指數依不添加或添加不活化菌體菌苗，分別為對數指數 1.75 與 1.93。天竺鼠免疫 2 次後，以 10 LD₅₀ 攻擊之結果防禦力各為 75 % 及 100 %，懷孕母豬分娩前 5 及 3 週各免疫 1 次及小豬 1 週齡及 3 週齡各免疫 1 次，其安全性百分之百，無任何不良反應，免疫母豬所生之小豬及間隔 2 週免疫 2 次之小豬，均可耐過在第五週齡時以強毒巴氏桿菌之連續攻擊。

關鍵詞：敗血巴氏桿菌，類毒素，疫苗

緒 言

敗血性巴氏桿菌 (*Pasteurella multocida*) D 群是家畜上呼吸道很重要之一種病原菌，它主要引起豬及兔之萎縮性鼻炎^[3, 4, 8, 9, 10]、肝壞死、淋巴球減少、血清補體力價上升及死亡。此類細菌之致病原因乃其可產生一種約 143 kda 之忌熱性蛋白質毒素 (*Pasteurella multocida* toxin, PMT)^[5]，由於其可使天竺鼠皮膚產生壞死性病灶，故又稱為皮膚壞死毒素 (Dermonecrotic Toxin, DNT)，此種毒素可使豬與鼠之造骨細胞受傷害，而正常生理之鼻甲骨蝕骨性吸收仍存在下，造成豬之萎縮性鼻炎^[1, 2]。以往使用巴氏桿菌不活化全菌產製之菌苗對豬之免疫並不理想，可能使用之菌株產毒能力不強，或毒素包埋於菌體，不易顯露出而產生免疫反應，因此擬嘗試選株培養，並萃取其

毒素，經不活化後免疫小白鼠及豬，以瞭解其免疫能力。

材料與方法

敗血性巴氏桿菌 D 群產毒菌株之選取

由台大獸醫學系所分讓之 14 株敗血性巴氏桿菌，係由巴氏桿菌病肺炎豬之肺所分離，經鑑定為本菌者，各菌株分別增菌培養及冷凍乾燥保存後，取部份作培養及鑑定試驗，並取少量培養經超音波處理後，接種天竺鼠皮膚及小白鼠以選取生產皮膚壞死毒素最佳之種菌株。

敗血性巴氏桿菌粗毒素 (PMT) 之萃取

敗血性巴氏桿菌經培養於血液寒天及腦心浸液培養基中，並添加不同量之兔血清或代血

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

清，以測定最佳之培養方式及時間。培養之菌體以超音波^[9]或藥劑處理法^[6, 7, 8]抽取菌體中之毒素。超音波法簡述如下：離心後之培養菌體懸浮於 10 倍量之 10 mM Tris buffer (pH 8.0) 加 10 mM EDTA，以 10 KC 之超音波擊打 3 次，每次 10 分鐘，離心，取上清液以 0.22 μ m 過濾膜過濾而成。藥劑處理法簡述如下：培養之菌體懸於 10 倍量之 50 mM Tris-NaCl Buffer (pH 7.3) 加 5 mM EDTA，50 μ g / ml Lysozyme，0.1 % Triton X-100， 10^{-7} M Pepstatin A，及 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)，於室溫中攪拌 4 小時，離心，上清液於 50 mM Tris-NaCl Buffer (pH 7.3) 透析，以 40 % 硫酸銨沉澱毒素蛋白，再於 0.02 M Phosphate buffer (pH 6.5) 透析，離心取上清液而成。

毒素之蛋白質含量測定

毒素蛋白濃度之測定使用 BCA (Bicinchoninic acid) 法^[12]亦即利用蛋白質在鹼性溶液中會與 2 價銅離子反應產生 1 價之離子 (Biuret reaction)，而每一分子 1 價銅離子可與二分子之 BCA 結合成水溶性藍色之原理，而已可以波長 562 nm 之光電比色儀測定其呈色而間接測定蛋白之濃度。測定時先把 BCA 反應劑 (Pierce) 之 A 劑 50 ml 加 B 劑 1 ml，混合而成 BCA 反應劑，取 2 ml 加入 0.1 ml 待測蛋白液，混合後放 37 °C 30 分鐘後以波長 562 nm 其呈色度。以標準蛋白 (牛血清白蛋白) 稀釋成每 ml 含量 1.2, 1.0, ……，0.2 mg，測其在波長 562 nm 之 OD 值，並製成標準直線迴歸，待測樣品如上述測定其 OD 值後，即可由標準線求得其蛋白含量。

毒素之純化

毒素以管柱法純化^[6, 7, 8, 9]簡述如下：約 40 ml 之粗毒素加入 DEAE-Sepharose 管柱 (2.6 \times 19 公分)，先以 0.05 M Sodium Phosphate Buffer (pH 7.2) 平衡，再以同樣 Buffer 加 0~0.5 M NaCl 分取，收集其第二波峰液，以超過濾膜 (YM-10) 濃縮，再通過 Sephacryl S-200 管柱，先以 Tris-NaCl buffer (pH 8.3) 含 2 mM EDTA 液平衡，再以同 Buffer 流出第二波峰，經濃縮即

成純化毒素。

毒素之力價測定：毒素調整濃度為每 ml 含 1 mg 之蛋白濃度後，以 2 倍稀釋後，各取 0.1 ml 皮內接種天竺鼠，接種後 48 及 72 小時，檢查皮膚之紅腫，其直徑在 0.5 公分以上者為陽性，依此評估毒素之力價。

巴氏桿菌類毒素疫苗之產製

選取之敗血性巴氏桿菌菌株 1 株，經培養後，收集之菌體以超音波抽取毒素，抽得之毒素經測定並調整其蛋白質含量，及以天竺鼠皮內接種依前述之方法，稀釋後接種測其皮膚壞死力價。毒素以 0.37 % 甲醛液予以不活化成類毒素，添加或不添加不活化巴氏桿菌體，並加入鋁膠佐劑後成為類毒素疫苗。類毒素與不活化菌體在添加佐劑前，均分別測定無毒素活性及無活菌，並加適量之亞硫酸鈉以中和過剩之甲醛。

類毒素疫苗之實驗動物試驗

類毒素疫苗分別以皮下、肌肉及腹腔內接種小白鼠各 10 隻及天竺鼠各 4 隻，小白鼠各 0.1 ml 及天竺鼠各 0.5 ml，接種後均觀察 30 天，檢查其減毒安全性，必需不會產生皮膚病變者。效力試驗使用小白鼠 150 隻等分成三群，第一及二群分別接種添加及不添加不活化巴氏桿菌體之類毒素疫苗，第三群為不免疫之對照組，小白鼠每隻各接種 0.1 ml，間隔 10 天免疫 2 次，第 2 次免疫後第 14 天，各群小白鼠各分成 5 組，每組 10 隻，分別以培養 20 小時之巴氏桿菌液攻擊，測定其防禦力價。天竺鼠 12 隻均分為 3 組各 4 隻，第 1 及第 2 組分別免疫添加或不添加不活化菌體之類毒素疫苗，第 3 組為不免疫對照組，間隔 10 天免疫 2 次，第 2 次免疫後 2 週，以培養之巴氏桿菌液攻擊。

類毒素疫苗對豬之免疫試驗

懷孕母豬產前約第 5 及第 3 週分別各免疫類毒素疫苗一次，皮下接種 5 ml。免疫前及分娩時均採血，以測其抗體之力價。所生之小豬於第 5 週齡時，先以支氣管敗血博德氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 菌液 7×10^9 / ml 鼻

腔內接種，3 天後再以培養 20 小時之新鮮產毒敗血性巴氏桿菌液 5.6×10^9 / ml 鼻腔內接種，連續攻擊 5 天，以測定被動免疫之保護性。

未免疫母豬所生之小豬，於 1 週齡及 3 週齡時分別以類毒素疫苗皮下接種各 2 ml，免疫後 2 週亦即約第 5 週齡如上述之攻擊以測定其效力，小豬於疫苗接種前及攻擊前均採血測其抗體。另一些未免疫母豬所生之小豬，不作免疫，於第 5 週齡時，同時作攻擊為對照組。

小豬攻擊後之評估

小豬攻擊後除觀察其臨床上之反應如精神，流鼻水，食慾及增重情形，全部小豬並在攻擊後第 4 週全部剖殺檢查鼻甲骨，依其鼻甲病變之嚴重程度給予 一，十，卅，卅，及卅等之評估。

抗體之測定

依 Sawada 等^[11] 之方法以間接血球凝集法測定，但其抗原採用類毒素抗原。

結 果

測試結果由豬分離之 14 株巴氏桿菌有 2 株可產生毒素，經選 1 株培養於血液寒天及腦心培養基中培養 20 小時，於腦心浸液液培養基培養時分別添加 5 及 10% 兔血清或代用血清 (Serum Plus)，經 20 小時之攪動培養，其最後產生之活菌量如表 1，靜止培養雖添加 10% 兔血清其培養活菌數顯著較攪動培養為低，添加 10% 兔血清在攪動培養中活菌數較使用代血清者略高，但添加量為 5% 時，其活菌數反較代血清為略低，但不顯著，代血清添加 10% 與 5% 量對菌量之產生並無差異。

收集或離心收集菌體，分別以超音波及藥劑處理法抽取毒素，液體培養基之培養上清液亦以硫酸銨處理，抽取蛋白質作比較。所得之蛋白質液經 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾膜過濾後，以 BCA 法測定其蛋白質含量，結果各抽取物蛋白質含量如表 2，培養濾液以硫酸銨抽取所得之蛋白質含量最高，但在接種天竺鼠皮內壞死反應時，一如表 2 所示均無反應。菌體之毒素抽取，一般以超音波抽取者，

其蛋白質含量較高，但其力價並未一定相對之提高，如血液寒天培養收集之菌體，其蛋白質含量較液體培養基培養之菌體者為高，但其天竺鼠皮內壞死反應則顯著較低。菌體以超音波第二次抽取之蛋白質量很多，但其天竺鼠皮內壞死反應則較第一次抽取呈顯著低落。以藥劑抽取者雜質量較少，天竺鼠皮內壞死反應力價相當高，但因其過程較複雜，所得之量如表 2 所示，亦呈偏低。

取約 40 ml 之粗製毒素蛋白質液，以 DEAE-Sephacryl S-200 管柱純化，結果得約 4 ml 之純化毒素蛋白，其蛋白質含量 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，對天竺鼠皮膚壞死性反應力價為 1:32，即約 6 ng 即可引起天竺鼠皮膚壞死性反應。

類毒素疫苗之安全性：類毒素疫苗經分別以皮下、肌肉內及腹腔內接種小白鼠，接種後經 30 天，均無發現有任何不良反應。懷孕母豬及小豬，接種 2 次，經 2 週，亦未發現有不正常反應。

類毒素疫苗之效力試驗：小白鼠 3 群，每群各 50 隻，分別免疫含 (B 組) 與不含不活化巴氏桿菌體 (A 組) 類毒素疫苗，免疫後以培養 20 小時之巴氏桿菌液，各各 0.1 ml 皮下注射攻擊，其結果如表 3。類毒素疫苗含與不含不活化疫苗之防禦力價分別為對數指數 1.93 及 1.75，即為 85.2 倍及 56.3 倍。天竺鼠 3 組，每組各 4 隻，經分別免疫含 (B 組) 與不含不活化巴氏桿菌體 (A 組) 之類毒素疫苗，免疫後以培養 20 小時之巴氏桿菌液，各 0.5 ml 皮下注射攻擊，其結果如表 4。對照組之天竺鼠全部發病死亡，免疫組除 A 組之 1 隻嚴重虛弱，於攻擊後第 11 天死亡外，其餘經 14 天均健存，其防禦率分別為 75% 及 100%。

類毒素疫苗對豬之免疫效力試驗之結果如表 5。對照組均有鼻甲骨重度至嚴重之病變，免疫組除被動免疫組有 2 頭有輕度病變外，其餘均無鼻甲骨之病變。試驗豬之抗體測定結果如表 6，小豬在 1 週齡及 3 週齡各免疫 1 次後，第 5 週之抗體均在 16 倍以上，足可抵抗巴氏桿菌之攻擊。被動免疫方面，小豬在 1 週齡時之移行抗體價相當高，到第 3 週後即降到 16 倍以下，第 5 週攻擊時降至 8 倍以下，但亦可抵抗連續之菌攻擊。

表 1. 添加劑對巴氏桿菌在腦心浸液培養基培養之活菌量 (ml)

測 試 序	10 % 兔血清	5 % 兔血清	10 % 代血清	5 % 代血清	靜 置 培 養
I	6.78×10^9	2.94×10^9	3.98×10^9	3.90×10^9	4.25×10^7
II	9.60×10^9	2.69×10^9	5.37×10^9	5.86×10^9	7.68×10^6

表 2. 不同抽取方式之粗製 DNT 蛋白質含量及其對天竺鼠皮膚壞死毒反應力價

樣 品	菌 材 料	抽 取 方 法	稀 釋 倍 數	OD 測 值*	OD** 實 際 值	蛋 白 質 含 量 (mg/ml)	GP 皮 內 反 應 力 價
1	Agar 菌 體	超 音 波	1 : 10	1.665	1.461	10.8	1 : 4
2	Broth 菌 體	第 一 次 超 音 波	1 : 10	0.918	0.714	4.6	1 : 32
3	Broth 菌 體	第 二 次 超 音 波	1 : 10	1.503	1.299	9.8	1 : 2
4	Broth 菌 體	藥 劑 處 理	1 : 1	1.541	1.337	1.0	1 : 64
5	Broth 培 養 液	硫 酸 鉍 抽 取	1 : 10	> 2.0	> 2.0	20.0	< 1 : 1
6	對 照	緩 衝 液	1 : 1	0.204	0.00	0.00	< 1 : 1

註* : λ 562 nm ; ** : 扣空白值。

表 3. 巴氏桿菌類毒素疫苗對小白鼠之防禦效力

攻 擊 菌 數	A 組		B 組		對 照	
	死 亡	存 活	死 亡	存 活	死 亡	存 活
2.55×10^8	7	3	6	4	10	0
2.55×10^7	3	7	2	8	7	3
2.55×10^6	0	10	0	10	6	4
2.55×10^5	0	10	0	10	4	6
2.55×10^4	0	10	0	10	0	10
LD ₅₀	$2.55 \times 10^{7.60}$		$2.55 \times 10^{7.68}$		$2.55 \times 10^{5.76}$	

MLD : A 組 $10^{1.75}$, B 組 $10^{1.93}$

表 4. 類毒素疫苗對天竺鼠之防禦效力

組別	死亡	存活	存活率 (%)
A	1	3	75
B	0	4	100
對照	4	0	0

表 5. 試驗小豬以活菌攻擊後鼻甲骨之病變情形

組別	試驗頭數	病變				
		(-)	(+)	(++)	(+++)	(####)
主免動組	8	8	0	0	0	0
被免動組	12	10	2	0	0	0
無免對照	6	0	0	0	2	4

註：-：無病變；+：輕度病變；++：中度病變
 +++：重度病變；####：嚴重病變

表 6. 巴氏桿菌類毒素疫苗免疫前後抗體力價（幾何平均）之消長

組別	頭數	第 1 次 免齡 後	第 2 次 免齡 後	攻 擊 約 5 週 前	剖 檢 約 9 週 前
主免動組	8	< 2	5	32	20
被免動組	12	28	10	4.3	13
無免對照	6	< 2	< 2	< 2	6

討 論

雖然培養液中添加 10% 兔血清所產生之活菌數較 10% 代血清略高，但為使毒素純化中雜質之量減至最少，乃決定使用代血清，又因 10% 與 5% 代血清量之添加對活菌數無顯著之影響，故最後決定使用 5% 之代血清應用於毒素菌苗之製造。

有關巴氏桿菌之皮膚壞死性毒素之存在位置爭論頗多，Rutter and Luther^[9] 認為它在細菌胞質內產生，因此其在液體培養基之濾液中亦可測出其毒素，只是其需在細菌發育之末期才能發現。但 Nakai 等^[6, 7, 8] 及其他之報告^[3, 4, 10]，均認為巴氏桿菌之毒素存在於其胞質間隙，所以培養濾液中之含量甚低，不管振盪培養或靜止培養，培養濾液中之毒素即使至細菌發育末期仍呈微量之存在，此點在國內吳等之報告^[1, 2] 亦如此。本次之試驗結果亦證明培養濾液中之皮膚壞死性毒素含量甚低，即使在粗製抽取液中亦未能測出。

於本試驗，純化之毒素 6 ng 即可引起皮膚壞死性反應，此雖不及 Nakai 等^[8] 所純化之毒素以 1 ng 即可產生同樣反應，但 Nakai 等^[8] 之純化過程更為複雜，不但管柱均通過 2 次，且另以電泳凝膠分離純製，尤其後者之處理僅能作極微量之收集，在作為類毒素之標準對照用，本試驗之純化過程應足以供用。

巴氏桿菌抗體之測定使用 Sawada 等^[11] 改良之間接血球凝集試驗，此種試驗之抗原雖然保存性並不能很久，但製造方法簡單而且經濟，此種試驗最重要乃與紅血球結合抗原之選擇，一般使用熱抽出之脂多醣抗原或硫氰鉀抽出之蛋白抗原，但此二種抗原之特異性較低，使用時其抗體力價必需在 8 倍以上才有意義，本次試驗為顧及使用之類毒素疫苗，故抗原亦使用精製之類毒素抗原，此種抗原結合之血球凝集抗原，特異性極佳，無免疫之小豬抗體力價均小於 2 倍。

為增加製造之實用性及減低製造成本，類毒素疫苗使用粗製類毒素，並添加不活化之巴氏桿菌體及氫氧化鋁膠佐劑，經小白鼠及天竺鼠等實驗動物之測試，發現添加不活化菌體可增加類毒

素疫苗之效果。類毒素疫苗兩次免疫小豬後之效果良好，所有免疫小豬可產生相當之抗體力價，並耐過連續巴氏桿菌液之攻擊，而可保護小豬之鼻甲骨，懷孕母豬在產前第 5 及第 3 週分別各免疫 1 次，其所生之小豬在吃過初乳後之 1 週齡，亦可得相當高之抗體力價，此種抗體雖在第 5 週已急劇下降，但仍可有效保護小豬對巴氏桿菌液之攻擊，由此可見本次試製之類毒素疫苗效果相當良好，值得進一步田間試驗擴大測試其效果。

參考文獻

1. 吳兆奇、沈瑞鴻、劉正義：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, 1992
2. 吳兆奇、劉正義、許添桓、沈瑞鴻：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, 1992
3. Cheville NF, Rimler RB, Thurston JR. A toxin from *Pasteurella multocida* type D causes acute hepatic necrosis in pigs. Vet. Pathol. 25 : 518 - 520, 1988
4. Cheville NF, Rimler RB. A protein toxin from *Pasteurella multocida* type D causes acute and chronic hepatic toxicity in pigs. Vet Pathol 26 : 148 - 159, 1989
5. DeJong MF, Borst GHA. Selective medium for the isolation of *P. multocida* and *B. bronchiseptica*. Vet. Rec. 116 : 167, 1985
6. Nakai T, Kume K. Purification of three fragments of the demonecrotic toxin from *Pasteurella multocida*. Res. Vet. Sci. 42 : 232 - 237, 1987
7. Nakai T, Sawata A, Tsuji M, Samejima Y, Kume K. Purification of demonecrotic toxin from a sonic extract of *Pasteurella multocida* SP-72 serotype D. Infect. Immun. 46 : 429 - 434, 1984
8. Nakai T, Sawata A, Kume K. Intracellular location of demonecrotic toxins in *Pasteurella multocida* and in *Bordetella bronchiseptica*. Am. J. Vet. Res. 46 : 870 - 874, 1985
9. Rutter JM, Luther PD. Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. Vet. Rec. 114 : 393 - 396, 1984
10. Sakano T, Okada M, Taneda A, Ono M, Sato S. Experimental atrophic in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol 31 : 197 - 206, 1992
11. Sawada T, Rimler RB, Rhoads KS. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. J. Clin. Microbiol 15 : 752 - 756, 1982
12. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner EH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klen DC. Measurement of protein using Bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150 : 76 - 85, 1985

Dermonecrotic Toxoid Vaccine of *Pasteurella multocida* Type D

Yi-Shing Wu, S. J. Chen, W. M. Chang, J. N. Shio

SUMMARY From 14 isolated strains *Pasteurella multocida*, two strains which produced dermonecrotic toxin (DNT) were selected. As the bacteria cultured in brain heart infusion adding 5 % serum plus for 20 hours , the harvest was sonicated for DNT. After the protein contain of toxin was determined, the protein concentration was adjusted to 1 mg per milliliter. The minimal necrotizing dose of rough DNT was about 3 µg of protein. The purified DNT from column chromatography could produce dermonecrotic reaction on guinea pig by 6 ng of protein.

Rough DNT toxin was inactivated with formaldehyde. Toxoid added inactivated *Pasteurella* cell suspension was mixed with alum gel adjuvant to form toxoid vaccines. Mouse vaccinated twice with the toxoid vaccines appeared 1.75 to 1.93 log folds of protected potency to the challenge of pathogenic *Pasteurella* cell suspension. Guinea pigs that had two times immuned with toxoid vaccines showed 75 to 100 % protected potency to LD₅₀ bacterial suspension challenge.

Pregnant sows at 3 ~ 5 weeks prior farrowing and piglets at 1 to 3 weeks of age were immuned twice with toxoid vaccines at an interval of 2 ~ 3 weeks showed completed safety and resulted in protecting the baby pigs and piglets to the challenged at 5 weeks old.

Keywords: *Pasteurella multocida* , Toxoid , Vaccine

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.