

豬博德氏菌、巴氏桿菌、放線桿菌、大腸桿菌、沙氏桿菌及假性狂犬病不活化混合菌（疫）苗之研製及田間應用試驗

陳清^{1*} 鍾明華¹ 詹益波¹ 呂清泉¹ 邱資峰¹
 賴俊雄¹ 柯浩然¹ 李清圳² 李典光² 李活模²
 吳育駿² 吳金島² 高基倉² 蔡貴雄²

1. 台灣省家畜衛生試驗所 製劑研究系
 2. 雲林縣家畜疾病防治所

摘要 多元菌苗免疫母豬，無論是鋁膠佐劑或油質佐劑均可產生 1:5,120~1:20,480 抗博德氏菌之凝集抗體價。4 日齡哺乳仔豬之被動抗體價 1:1,413~1:4,305，嗣後隨週齡之增加而遞減。實驗室免疫母豬其血清及初乳之抗假性狂犬病之中和抗體價自 1:11~1:256 不等。而 4 日齡哺乳仔豬之中和抗體價分別為 1:8.4~1:26.7，4 週齡之抗體價則為 1:3.6~1:7.4，但 8 及 12 週齡仔豬之血清抗體價則均在 2 倍以下。田間免疫試驗懷孕母豬其免疫前及免疫後（產後）血清抗博德氏菌之抗體價有顯著之增加，免疫前抗體價之幾何平均值為 1:130~1:160，免後（產後）則分別為 1:3,566~1:3,670。而其 4 日齡哺乳仔豬抗體價之幾何平均值為 1:1,810~1:2,168。至於田間試驗母豬其免疫前、產後血清抗假性狂犬病抗體價之幾何平均值亦有明顯上昇，4 日齡及 4 週齡哺乳仔豬抗假性狂犬病之中和抗體價分別為 1:277~1:342 及 1:162~1:167 等。由上述之試驗成績得知，免疫抗體之上昇頗為滿意。

關鍵詞：博德氏支氣管敗血症桿菌，巴斯德出血性敗血症桿菌，胸膜肺炎放線桿菌，大腸桿菌，沙門氏桿菌，假性狂犬病毒，混合菌苗

緒言

豬多種抗原混合菌（疫）苗之使用，頗受養豬業者之期待與愛用，主要原因為勞力之短缺，以及期望減少預防注射之次數，緊迫與降低產銷成本，提昇競爭力。世界各國均不遺餘力的研究開發，我國亦不例外，本研究試製之多元混合菌（疫）苗，其安全性及在實驗室之免疫成績已提出評議會報告^[9]，本年度則以抗博德氏菌及抗假性狂犬病毒抗體消長及田間試驗成績提出報告如下：

材料與方法

(一)試驗材料：

1. 供試培養基：Potato infusion agar, Dextrose starch agar, Brain heart infusion, Brain heart infusion agar, Tryptic soy agar, Tryptic soy broth, 25% yeast extract, Eagle's MEM 及胎牛血清等。
2. 供試試藥：福馬林，Thimerosal，BEI，NaHCO₃，氫氧化鋁膠（33 mg/ml），MVP 油質佐劑（Emulsigen），及 Gentamicin 等。

*抽印本索取者
 台灣省家畜衛生試驗所

3. 供試細胞：PK-CL 株化細胞。
4. 供試菌(毒)株：部份為本所現用菌(疫)苗製造株，另一部份為開發研製用種株，已如前報所列^[9]。
5. 供試懷孕母豬：試驗室用懷孕母豬，係向新竹縣湖口農林廳輔導之示範種豬戶劉氏養豬場，選購未經含此等抗原菌(疫)苗免疫之懷孕母豬(3頭)供試。
6. 田間試驗用懷孕母豬及哺乳仔豬：係請雲林縣家畜疾病防治所協助洽商由某種豬場所提供之懷孕母豬 48 頭供試，及哺乳仔豬 91 頭供採血測試抗體之用。

(二)試驗方法：

1. 多元菌(疫)苗之研製：

- (A) 細菌性菌苗液之製備：應用細菌培養方法：分別以 Potato infusion agar、Dextrose starch agar, Brain heart infusion agar + yeast extract 及 TSA 等合適之固體培養基，分別培養豬博德氏菌、巴氏桿菌、胸膜肺炎放線桿菌、大腸桿菌及沙氏桿菌，於 37 °C 培養 15~18 小時，然後以緩衝生理食鹽水將菌苔洗下，分別將菌液調整適當濃度後，添加 0.3 % 福馬林不活化處理，並加入 0.01 % Thimerosal 為防腐劑(均為最終濃度)，作為菌(疫)苗原液之用。
- (B) 假性狂犬病病毒液之製備：應用豬腎由來並經本所鍾博士 Cloning 所得之 PK-CL 株化細胞，以 Eagle's MEM 加入 8 % fetal calf serum, 10 mM HEPES, 30 µg/ml gentamicin 及適量 NaHCO₃ 之培養液，經培養所得之病毒液，加入 0.002 M BEI (最終濃度) 在 37 °C 作用 10 小時後，經測試完全不活化後再濃縮 10 倍供為混合菌(疫)苗原液之用。
- (C) 1. 以適當比例，將上述二組原液加以混合後分為二組，一組以氫氧化鋁膠，另一組 MVP 油質佐劑，分別製成二種不同佐劑之混合菌(疫)苗供為免疫之用。
2. 試製多元菌苗於實驗室對懷孕母豬之免疫與其小豬移行抗體之檢測：由新竹縣湖口鄉之示範養豬戶選購之三頭懷孕母豬，分別供為試製之鋁膠佐劑菌苗、油質佐劑菌苗免疫用，另一頭為對照組，除對照組未免疫外，其餘二頭於產前 5 週基礎免疫肌肉注射 3 ml，2 週後補強注射 5 ml。母豬

初乳、產後血清及其生產之哺乳豬於 4 日齡、4 週齡 8 週齡及 12 週齡分別採血，以試管凝集反應法測試其抗博德氏菌抗體，以血清中和抗體法測試其抗假性狂犬病毒抗體之消長情形。

3. 試製多元菌苗於田間對懷孕母豬之免疫與其生產之哺乳豬移行抗體之檢測：於雲林縣林內鄉某豬場實施田間應用試驗，免疫方式及抗體測定均比照實驗室方式實施。至於小豬移行抗體之檢測，則僅以生後 3~4 日齡及 4 週齡血清樣本供試。

結 果

(一)試製多元混合菌(疫)苗於實驗室免疫懷孕母豬產生之抗博德氏菌及假性狂犬病抗體與哺乳仔豬移行抗體消長成績：

依試驗方法，將試製之多元混合菌(疫)苗以氫氧化鋁膠及油質佐劑調製之菌苗各免疫懷孕母豬一頭，於菌苗免疫注射前採血，懷孕母豬免疫後(產後)採血，哺乳仔豬於 4 日齡，4 週、8 週及 12 週齡各採血一次，測試其抗博德氏菌及抗假性狂犬病之抗體為指標，所得結果得知，鋁膠佐劑組菌苗免疫母豬產後 3~4 日血清中之抗博德氏菌抗體為 1:5,120，初乳為 1:20,480，至於其生產之哺乳仔豬 4 日齡，4、8 及 12 週齡之幾何平均值，分別為 1:1,413、1:430、1:145 及 1:59。油質佐劑菌苗免疫母豬產後 3~4 日血清抗博德氏菌之抗體價為 1:10,240，初乳為 1:20,480，至於哺乳仔豬 4 日齡，4、8 及 12 週齡之幾何平均值，分別為 1:4,305，1:905，1:380 及 1:95。二組相較，抗體價之產生，以油質佐劑組較高。詳如 Table 1 所示成績。

至於抗假性狂犬病之抗體價，無論是鋁膠佐劑菌苗組或油質佐劑菌苗組，免疫後母豬血清，初乳及哺乳仔豬之 4 日齡及 4 週齡均可測出抗體價，惟哺乳仔豬 8 週 12 週或對照組其抗體價均 ≤ 2，詳如 Table 2 所示成績。

(二)試製多元混合菌(疫)苗於田間免疫母豬產生之抗博德氏菌及假性狂犬病抗體與哺乳仔豬移行抗體消長成績：

目前田間懷孕母豬於免疫前大部份可檢出有抗體之存在，惟免疫後(產後)血清均可獲

很高之凝集抗體價，鋁膠組菌苗免疫前抗體價之幾何平均值為 1:130，免疫後（產後）為 1:3,566。油質佐劑組菌苗免疫前抗體價幾何平均為 1:160，免疫後為 1:3,670。可見兩組佐劑菌苗對懷孕母豬之免疫成績無明顯差異，詳如 Table 3 所示成績。至於哺乳仔豬之 4 日齡及 4 週齡之移行抗體價鋁膠組與油質佐劑組菌苗分別為 1:1,810 及 1:690 與 1:2,168 及 1:970，詳如 Table 4 所示成績。

(三) 試製多元菌苗於田間免疫懷孕母豬產生抗假性狂犬病抗體及哺乳仔豬之抗體消長成績：

供試田間懷孕母豬於免疫前均可檢出抗假性狂犬病之中和抗體價，鋁膠組菌（疫）苗為 1:111，免疫後（產後）提高為 1:240，油質佐劑組免疫前抗體之幾何平均值為 1:215，免疫後提高為 1:310，詳如 Table 5。至於哺乳仔豬之移行抗體價 4 日齡及 4 週齡成績，鋁膠組為 1:277 及 1:162，油質佐劑組為 1:342 及 1:167。兩組並無明顯之差別，詳如 Table 6 所示成績。

討 論

豬萎縮性鼻炎是一種世界性之豬嚴重的傳染病，雖有學者將其分為由產毒博德氏菌感染所引起之非進行性病型及由產毒巴氏桿菌所引起之進行性病型，以及由混合感染所引起者^[13]。然而，Sakano 等^[18]曾引述陳等^[6]及其他學者之報告，以博德氏菌及巴氏桿菌混合感染所引起之鼻甲骨萎縮較前述二種病原之單一感染者為嚴重之報告，並更進一步以 2 及 4 個月齡之初代 SPF 豬作 5 次（或 7 次）連續感染（每天 1 次），試驗結果得知 2 個月齡供試 SPF 豬，無論是接種博德氏菌或巴氏桿菌之單一病菌，臨床上及剖檢均未產生鼻甲

骨萎縮病變。但以博德氏菌 10^7 CFU/head 及巴氏桿菌 10^9 CFU/head 混合感染則可出現臨床上及剖檢上鼻甲骨之萎縮，此點與筆者陳等之報告（1989）兩種病原混合感染，病程加劇頗為吻合。Sakano 等^[18]更以博德氏菌 10^9 CFU/head 混合巴氏桿菌 10^9 CFU/head 連續 7 天感染 4 月齡初代 SPF 豬，雖未見臨床症狀，但剖檢供試 4 頭中有 3 頭均有輕度至重度鼻甲骨之萎縮。Sakano^[18]等認為陳等^[6]，Rutter^[17]及 Rutter & Rojas^[16]所使用供試豬隻為 0~2 週齡之幼齡仔豬，因此無論是接種博德氏菌或巴氏桿菌之單一菌感染均會引起鼻甲骨之萎縮。但渠等係使用 2 及 4 月齡豬隻，因此僅在混合二種病原之人工感染才出現臨床或剖檢變狀。可見二種病原對於豬萎縮性鼻炎乃扮演重要之角色。因此在本病預防用菌苗之開發，必須採用此二類之病原菌至為重要。

在本多元菌苗之研製，其抗原之使用除博德氏菌及巴氏桿菌外，尚包括放線桿菌、沙氏桿菌、大腸桿菌及假性狂犬病等抗原，種類繁多^[2, 3, 4]，在研製及品管評估頗多費時^[1, 5, 14, 15, 19]。陳等^[7, 8, 9]曾提出試製混合菌（疫）苗之安全試驗及以小白鼠模式檢驗評估其力價試驗成績，得知安全性高，且力價試驗結果，除假性狂犬病抗原必須再改進提高抗原力價外，其餘尚稱滿意^[10, 11, 12]。在本年度之試驗成績則以博德氏菌抗體之消長及假性狂犬病抗體之檢測及消長試驗為指標，進行試驗室及田間應用試驗之評估，其詳細成績已詳如 Table 1~6，結果尚稱滿意。

誌謝 本研究承蒙行政院農業委員會 85 科技 1.15-牧-03(6-1)，86 科技-1.1-牧-15(6) 經費之資助，田間試驗承蒙雲林縣大嘉農牧場張修信先生提供試驗豬隻得能順利完成，謹併誌萬分之謝忱。

Table 1. Development of anti-*Bordetella bronchiseptica* titer of sows vaccinated by inactivated *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *E. coli*, *salmonella*, with pseudorabies virus combined vaccine and vicisitudes of passive antibody titers of their offspring in laboratory.

Kind of vaccine	Material or No. of and sow No. tested	Agglutination titer (1 : X)											GMT*				
		≤10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120	10,240 ≥		20,480			
Al-gel adjuvanted vaccine, 6-4	Serum before vac.															20	
	Colostrum															20,480	
	Serum after farrowing	(1)	7														5,120
		(2)	7														430
6-4	(3)	7														145	
	(4)	7														59	
Emulsigen oil adjuvanted vaccine, 6-1	Serum before vac.															20	
	Colostrum															20,480	
	Serum after farrowing	(1)	8														10,240
		(2)	8														4,305
6-1	(3)	8														905	
	(4)	8														380	
Control 11-3	Serum before vac.															10	
	Colostrum															80	
	Serum after farrowing	(1)	9														40
		(2)	8														18.5
11-3	(3)	8														15.8	
	(4)	8														18.8	

Remarks : (1) Blood sampling on 4 days old of piglets. (2) Blood sampling on 4 - week - old. (3) Blood sampling on 8-week-old. (4) Blood sampling on 12 - week - old.
* Geometric mean titer

Table 2. Development of anti - *Pseudorabies virus* titer of sows vaccinated by inactivated *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *E. coli*, *salmonella*, with pseudorabies virus combined vaccine and vicissitudes of passive antibody titers of their offspring in laboratory.

Kind of vaccine and sow No. tested	Material or No. of Piglet blood sampling	Serum neutralization titer (1 : X)											GMT						
		≤2	4	6	8	11	16	22	32	90	128	≥256							
Al-gel adjuvanted vaccine,	Serum before vac.	+													VI	2			
	Colostrum														+	256			
6-4	Serum after farrowing	(1)	7		2		3				1		1			+	32		
		(2)	7		5		1		1								8.4		
		(3)	7		7													3.6	
		(4)	7		7													VI	2
Emanligen oil adjuvanted vaccine,	Serum before vac.	(1)	8															VI	2
		(2)	8				3		3		2							90	
		(3)	8									1						+	
		(4)	8										1		1	6		11	
Control 11-3	Serum after farrowing	(1)	9															VI	2
		(2)	8															VI	2
		(3)	8															VI	2
		(4)	8															VI	2
Control 11-3	Serum before vac.	+																VI	2
	Colostrum	+																VI	2

Remarks : (1) Blood sampling on 4 days old of piglets.

(2) Blood sampling on 4 - week - old.

(3) Blood sampling on 8 - week - old.

(4) Blood sampling on 12 - week - old.

Table 3. Distribution of antibody titer against *Bordetella bronchiseptica* of sows immunized with inactivated *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *E. coli*, *Salmonella* and *Pseudorabies virus* combined vaccine in field trial.

Kind of vaccine used	No. of Sow tested	No. of blood Sampling	Agglutination titer (1 : X)										GMT			
			≤ 10	20	40	80	160	320	640	1,280	2,560	5,120		≥ 10,240		
Al - gel																
adjuvanted vaccine	23	(1) 10 (2) 23	1		1	1	3	4			1	3	6	10	3	130
Emulsigen oil adjuvanted vaccine	25	(1) 10 (2) 25	2		1	1	1	3	3			5	7	8	5	160 3,670

Remarks (1) : Blood sampling before basic vaccination of sows.
(2) : Blood sampling on 3 - 4 days after piglets was farrowing of sows.

Table 4 Vicissitudes of passive antibody titer against *Bordetella bronchiseptica* of piglets born from sows immunized with inactivated *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *E. coli*, *Salmonella* and *Pseudorabies virus* combined vaccine in field trial.

Group of sow vaccinated with h	No. of sow tested	No. of piglet born	No. of piglet sampling (2 / litter)	Agglutination titer (1 : X)										GMT		
				160	320	640	1,280	2,560	5,120	≥ 10,240						
Al - gel																
adjuvanted vaccine	23	176	46	(1) (2)	2 3	2 12	5 10	12 19	13 2	11	1	1,810	690			
Emulsigen oil adjuvanted vaccine	25	197	50	(1) (2)	3	4 8	3 10	15 18	13 7	9 4	6	2,168	970			

Remarks : (1) Blood sampling on 3 - 4 days old of piglets.
(2) Blood sampling on 4 - week - old of piglets.

參考文獻

1. 行政院農業委員會編印：動物用藥品檢驗標準，臺北 P. 32-33, 57-58, 64-66, 66-67, 87-88。1994
2. 張靖男、陳鴻文、嚴家清、沈詠梅：豬胸膜肺炎菌苗田間應用之研究，臺糖畜產研究所 68/69 年期研究報告 P. 103-112。1980
3. 張惟茗、吳義興、楊喜金、林士鈺：豬胸膜肺炎嗜血桿菌之研究 (III) 類內毒素及溶血素之免疫保護效果。台灣省政府農林廳八十一年度試驗研究報告書。P. 117-125。1992
4. 陳清、呂清泉、詹益波、賴俊雄、張天桂、林旭志、周寬典、李清圳、楊宗德、蔡貴雄、吳森江、陳光男：豬博德氏菌與巴氏桿菌混合菌苗之研製與應用，台灣省家畜衛生試驗所研究報告。NO. 22. 41-48。1986
5. 陳清、呂清泉、詹益波、賴俊雄、張天桂、林旭志：豬大腸桿菌疫苗對小白鼠免疫效力之評估試驗，台灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 22. 33-40。1986
6. 陳清、呂清泉、賴俊雄、張天桂、詹益波：人工感染博德氏菌、巴氏桿菌及其混合感染引發之豬萎縮性鼻炎，中華獸醫誌 15 (2) 129-137。1989
7. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、詹益波、邱仕炎：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性與效力。中華民國獸醫學會雜誌 (17) 159-167。1991
8. 陳清、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、詹益波：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。中華民國獸醫學會雜誌 20 (4) 327-337。1994
9. 陳清、鍾明華、詹益波、呂清泉、賴俊雄、柯浩然：豬博德氏菌、巴氏桿菌、放線桿菌、大腸桿菌、沙氏桿菌及假性狂犬病不活化混合菌(疫)苗之研製。台灣省政府農林廳八十四年度試驗研究報告書。P. 229-240。1996
10. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峰、曾文正：豬假性狂犬病不活化疫苗佐劑之改進研究，台灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 22. 81-88。1986
11. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峰、紀長文：假性狂犬病 TK 變異株之病原及其免疫保護效力，台灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 23. 141-146。1987
12. 鍾明華、李淑慧、詹益波、邱資峰：假性狂犬病 gI 基因缺失不活化疫苗開發及其佐劑之研究，台灣省政府農林廳八十三年度試驗研究報告書。295-309。1994
13. Gatlin Cindy L., Jordan William H., Shryock Thomas R. and Smith Wendell C. : The Quantitation of Turbinate Atrophy in pigs to measure the severity of Induced Atrophic Rhinitis. Can, J. Vet, Res, 60, 121-126. 1996
14. Katsumi Kume and Nakai Toyotsugu : Efficacy of a bivalent vaccine containing serovar 2 and 5 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs or in guinea pigs Jpn, J. Vet, Sci, 50 (1) 237-241. 1988
15. Ohgitani, Uchida T. C., Okabe T. and Sasaki N. : Protective effect by Supernatant of Phase 1 *Bordetella bronchiseptica*, Jap, J. Vet. Med, Sci, 54 (1) 37-42. 1991
16. Rutter, J. M. and Rojas, X., Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets : Differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. Vet. Rec. 110 : 531-535. 1982
17. Rutter, J. M. : Atrophic Rhinitis in Pigs. Pig News and Information No. 4 385-387. 1987
18. Tetsuya Sakano, Okada Munenori, Taneda Atsuyoshi, Ono Masaaki and Sato Shizuo : Experimental atrophic rhinitis in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 31, 197-206. 1992
19. Straw, B. E., Maclachlan N, J., Corbett W. T., Carter P. B. and Schey H. M. : Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. Can, J. Comp, Med, 49, 149-151. 1985

Development and field application of *Bordetella*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and Pseudorabies virus inactivated combine vaccine for swine

CHEN Ching,^{1*} M. H. Jong,¹ I. P. Chan,¹ C. C. Lu,¹ T. F. Chiou,¹
J. S. Lai,¹ H. J. Ko,¹ C. J. Li,² T. K. Li,² F. M. Li,² Y. C. Wu,²
K. T. Wu,² C. C. Kao,² and Q. S. Tsai.²

1. Taiwan Animal Health Research Institute.

2. Yun-Lin Livestock Disease Control Center

SUMMARY The sows immunized with poly-valent vaccine, adjuvanted with either aluminum hydroxide gel or oil adjuvant, developed antibody titers ranged from 1 : 5,120 to 1 : 20,480 against *Bordetella bronchiseptica* (*B.b*) antigen as determined by using tube agglutination test. The passive antibody titers were 1 : 1,413 to 1 : 4,035 in their 4 days old piglets. As the piglets grew older, the antibody titers decreased.

In the laboratory, the antibody titer developed against pseudorabies (Pr.) antigen from the serum and colostrum of the sows after vaccination varied from 1 : 11 to 1 : 256 by serum neutralization test. The passive antibody titers were 1 : 8.4 to 1 : 26.7 and 1 : 3.6 to 1 : 7.4 for their 4-day and 4-week old piglets, respectively. After 8 and 12 weeks old, those values dropped below 1 : 2.

In the field trial, the serum antibody titers against *B.b* for the vaccinated sows ranged from 1 : 130 to 1 : 160 in prevaccination and 1 : 3,566 to 1 : 3,680 on 3-4 days after farrowing. The geometric mean titer (GMT) of the passive immune titer measured 1 : 1,810 to 1 : 2,168 for their 3-4 days old piglets. The GMT antibody titer against Pr. antigen of sows after vaccination also increased distinguishably. For their 4-day and 4-week old piglets, the passive antibody titer varied from 1 : 277 to 1 : 342 and 1 : 162 to 1 : 167, respectively. Based on these experimental results, the increase in the immune antibody titers were fairly satisfactory.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudorabies virus*, *Combination vaccine*

*Corresponding author

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