

台灣禽畜敗血性出血性巴氏桿菌之血清型及生化學特性

呂榮修* 蔡向榮 曾俊憲 林地發

臺灣省家畜衛生試驗所

摘要 收集自 1974 年以來在家禽、豬、牛及鹿等分離之巴氏桿菌 (*Pasteurella multocida*) 共 111 株，以急速冷凍乾燥法保存供為本試驗菌株，經以 Carter 的間接血球凝集試驗法調查供試菌株之莢膜血清型，結果 111 株全屬 A 型。另以 Heddleston 的瓊膠擴散沈澱試驗法調查供試菌株之菌體血清型，結果屬於 1 型有 89 株 (80.2%)，3 型有 16 株 (14.4%)，8 型有 5 株，9 型有 1 株。由來動物別，牛分離株 1 株屬 3:A 血清型，鹿 1 株屬 1:A 血清型，豬 14 株分別屬於 1:A (2 株)，3:A (8 株) 及 8:A (4 株) 血清型。由禽類分離之 95 株除鴨有 2 株分別為 8:A 及 9:A 血清型外，全部屬於 1:A (86 株，90.5%) 或 3:A (7 株，7.4%) 血清型。取 84 株 *P. multocida* 菌株進行醣類分解及生化性狀試驗，結果顯示所有菌株有一致的生化性狀，且對半乳糖 (galactose)、葡萄糖 (glucose)、甘露糖 (mannose) 及甘露醇 (mannitol) 全部具有發酵作用。對其他醣類則有不等百分比的供試菌株有發酵作用，如蔗糖 (sucrose) 有 96.4%、阿拉伯糖 (arabinose) 88.1%、山梨醇 (sorbitol) 33.3% 及麥芽糖 (maltose) 2.4% 的供試菌株有發酵作用。〔*呂榮修、蔡向榮、曾俊憲、林地發。台灣禽畜敗血性出血性巴氏桿菌之血清學及生化學特性。中華獸醫誌 20 (2) : 155~161, 1994。*聯絡人 TEL : (02) 621-2111, FAX : (02) 622-5345〕

關鍵詞：敗血性出血性巴氏桿菌，莢膜血清型，菌體血清型，醣類發酵

緒言

Pasteurella multocida 菌株可造成許多家禽畜的感染，如家禽霍亂 (fowl cholera)、牛的運輸熱 (shipping fever)，及其他動物的出血性敗血症 (hemorrhagic septicemia)，另外在許多健康的家畜、豬及倉鼠的呼吸道保有本菌而為傳播源^(5,9,22,23)，因此本菌感染宿主相當廣泛。

本菌業已根據免疫學和血清學的特性分類成數群，Little 和 Lyon⁽¹²⁾ 利用平板凝集 (slide agglutination) 和被動保護 (passive protection) 試驗分類 *P. multocida* 為三型，另外 Roberts⁽²⁰⁾ 亦將本菌分類為 7 或 8 個血清型。而 Carter^(3,4) 及 Rimler 和 Rhoades⁽¹⁹⁾ 利用可溶性之莢膜多醣體抗原進行間接血球凝集試驗 (indirect hemagglutination test,

IHA) 將 *P. multocida* 分類為 A、B、D、E、F 五種莢膜血清型。另外 Namioka 及 Murata^(14,16,17) 利用平板凝集試驗來測試莢膜 (K) 與菌體 (O) 抗原 (capsular and somatic antigen)，將 *P. multocida* 分類為 15 個血清型。最後在 1972 年 Heddleston 等⁽¹¹⁾ 首先利用瓊膠擴散沈澱試驗 (gel diffusion precipitin) 試驗分類家禽 *P. multocida* 菌株之菌體血清型。目前 Brogden⁽²⁾ 已將與家禽霍亂 (fowl cholera) 有關的菌株分類為 16 種血清型。

1982 年 Chang⁽⁷⁾ 依 Namioka 血清型分類法將台灣分離的 *P. multocida* 菌株進行血清型 (O 抗原：K 抗原) 鑑定；結果顯示 5:A 型者 60 株，5:K 抗原未決定為 29 株，而 1:K 抗原未決定有 5 株。由此可見台灣對 *P. multocida* 的血清型並未有完全的分類。因此在本調查中以本研究室收集之 111 株台

*抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌第 20 卷第 2 期：155-161, 1994
台灣省家畜衛生試驗所

灣分離菌株為對象進行血清型的分類，同時並檢查其生化學性狀以供為參考。

材料與方法

供試菌株與培養基

供試菌株是由 1970~1993 年間於台灣地區自雞、鵝、天鵝、火雞、豬、牛、及鹿等家畜禽分離並以急速冷凍乾燥法保存之 111 株 *P. multocida* 菌株。另外供為菌體抗原製造之 16 個菌體血清型代表株⁽¹¹⁾ 及供為莢膜抗原製造用之 A 型 P-3827 與 D 型 P-3881 代表株係由日本獸醫畜產大學澤田拓士博士所分讓。所有供試菌株經培養於 dextrose starch agar (DSA, Difco) 後供為試驗用。

醣類發酵與生化性狀試驗

參照 Brogden⁽²⁾ 及 Heddleston^(10,11) 的方法進行 galactose、glucose、maltose、mannose、mannitol、sucrose、arabinose、xylose、dulcitol 及 sorbitol 等醣類之菌株發酵作用。另亦測試 MR、VP、citrate、urease、hemolysis、DHL medium、gelatin hydrolysis、indole、catalase、oxidase、ornithine decarboxylase 及 nitrate reduction 等生化性狀試驗。

菌體血清型測試 (somatic serotyping)

依 Brogden⁽²⁾ 及 Heddleston⁽¹¹⁾ 之方法實施。

菌體抗原之製備：將供試菌株（包括 16 株標準菌株）培養於直徑 9 cm 之 dextrose starch agar (DSA) 培養皿中，並放置於 37 °C 恆溫箱中培養 18 小時後，刮取菌落後每片用 1 mL 含 0.85 % NaCl 及 0.3 % 福馬林 (formalin) 之 0.02M 磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 懸浮菌液後置於 121 °C，1 小時，並以 4,000 rpm 離心 30 分鐘，此上清液即為菌體抗原。

抗菌體血清之製備：取標準株培養於 dextrose starch agar，並置於 37 °C 恆溫箱 18 小時後，並以含 0.3 % 福馬林之 0.85 % 生理鹽水收取菌落，再以分光光度計 (spectrophotometer, Model 6-A) 調製成密度為 10× 的 McFarland (OD600 0.1)。並以 arlacel A 調製成含 0.3 % arlacel A 的油質佐劑菌苗，取 1.0 mL 以皮下注射接種 3 個月齡的雞，3 週後犧牲雞採收血清，此血清添加 0.01 % thimerosal 和 0.06 % phenol，並貯存於 4 °C。

瓊膠擴散沉澱試驗 (gel-diffusion precipitin test, GDPT)：首先製備含 8.5 % NaCl 及 0.01 %

thimerosal 之 0.9 % Nobleagar (Difco)，當瓊膠完全溶解後，吸取 5~6 mL 置於 25 × 75 mm 玻片 (microscope slide) 上，待瓊膠凝固後以挖孔器鑽孔為中央 1 孔及周圍 6 孔，其每孔之直徑為 4 mm，而周圍孔距中央孔為 6 mm 長，中央孔放置標準抗血清，而測試抗原則放置在周圍 6 孔，最後放置在 37 °C 恆溫箱中 24 小時後，再置於室溫觀察 7 日。

莢膜血清型測試 (capsular serotyping)

依 Carter⁽³⁾ 及 Rimler 及 Rhodes⁽¹⁹⁾ 的方法實施。

莢膜抗原之製備：將供試株（包括標準株 - A 型 P-3827 及 D 型 P-3881）培養於 DSA 培養基，並放置於 37 °C 恆溫箱中 18 小時後，刮取菌落並以 1 mL 0.02 M PBS 浮，於 100 °C 中加熱 1 小時，再經 4,000 rpm 離心 30 分鐘，並收集上清液即為莢膜抗原。

莢膜型抗血清之製備：取標準株 A 型 P-3827 及 D 型 P-3881 菌株培養於 DSA，在 37 °C，4 小時後，以 0.85 % NaCl (含 0.3 % formalin) 收取菌落，再以分光光度計調整密度為 4× 的 McFarland (OD600 0.1)，取 0.1 mL 皮內注射接種於 20 週齡之兔子，接種後 1 週再行補強注射 1 次，3 週後則犧牲兔子以收取血清。血清中亦添加 0.1 % thimerosal 及 0.06 % phenol，並貯存於 4 °C。另外 B、E、F 莢膜型抗血清係由日本獸醫畜產大學澤田拓士博所分讓。

間接血球凝集試驗 (indirect hemagglutination test, IHAT)：取已製備之 0.3 mL 莢膜抗原與 10 % 綿羊紅血球 0.1 mL 混合均勻，並置 37 °C 恆溫箱中感作 1 小時後，以 0.02M PBS (含 0.25 % bovine serum albumin, BSA 及 0.01 % NaN₃) 清洗 3 次，再以 0.02M PBS 配成 0.5 % 抗原綿羊紅血球懸浮液，而後再與標準抗血清進行 IHAT，並在室溫靜置 1 小時後判讀。

結果

台灣分離 *P. multocida* 菌株醣類發酵試驗與生化性狀試驗結果

84 株菌株經生化性狀試驗測定結果顯示一致之生化性狀 (表 1)，即對 MR、VP、citrate、urease、hemolysis、DHL medium 及 gelatin hydrolysis 皆為陰性反應，而對 indole、catalase、oxidase、ornithine decarboxylase 及 nitrate reduction 等試驗皆為陽性反應。

表 1 台灣分離之 84 株 *Pasteurella multocida* 之生化性狀試驗結果

試 驗	菌 株 由 來 動 物 別 及 菌 株 數									
	雞 18	鴨 41	鵝 9	天鵝 2	火雞 2	鴿 2	豬 8	牛 1	鹿 1	
MR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DHLmedium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole (SIM)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 2 台灣分離之 84 株 *Pasteurella multocida* 之醣類發酵作用

醣 類	菌 株 由 來 動 物 及 其 株 數									
	雞 18	鴨 41	鵝 9	天鵝 2	火雞 2	鴿 2	豬 8	牛 1	鹿 1	合計 (%)
Galactose	100 ^a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Glucose	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Maltose	5.6	2.4	0	0	0	0	0	0	0	2.4
Mannose	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mannitol	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sucrose	94.4	95.1	100	100	100	100	100	100	100	96.4
Arabinose	94.4	90.2	88.9	100	0	0	50	0	0	88.1
Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sorbitol	11.1	26.8	44.4	50	59	50	100	0	0	33.3

a 發酵菌株數 / 供試菌株數之百分比

表 3 台灣分離之 *P. multocida* 菌株之血清型鑑定結果

Heddleston 菌體血清型	莢膜 血清型	動物別									合計
		牛	鹿	豬	天鵝	鵝	鴨	火雞	雞	鴿	
1	A	0	1	2	1	14	52	1	18	0	89
3	A	1	0	8	1	1	2	1	0	2	16
8	A	0	0	4	0	0	1	0	0	0	5
9	A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
計		1	1	14	2	15	56	2	18	2	111

84 株 *P. multocida* 菌株對醣類之發酵作用則有變異 (表 2)。其中對 galactose、glucose、mannose 及 mannitol 等醣類全部菌株都具有發酵作用, 但對 maltose 有 2.4%、對 sucrose 有 96.4%, 對 arabinose 有 88.1% 及對 sorbitol 有 33.3% 的菌株具有發酵作用, 所有菌株對 xylose 及 ducitol 皆無發酵作用。

台灣分離 *P. multocida* 菌株血清型鑑定結果

台灣地區分離之 111 株 *P. multocida* 進行莢膜血清型及菌體血清型鑑定, 結果如表 3, 111 株菌株全為 A 型莢膜血清型。至於菌體血清型則有 89 株 (80.2%) 屬於 Heddleston 1 型, 16 株 (14.4%) 屬於 Heddleston 3 型, 另有 5 株 (4.5%) 屬於第 8 型, 而第 9 型則 1 株, 如以動物別來看, 牛 1 株屬於 3:A 血清型, 鹿 1 株屬於 1:A 血清型, 豬 14 株分別為 1:A (2 株)、3:A (8 株)、8:A (4 株) 血清型, 禽類則以 1:A 型最多有 86 株, 3:A 型次之有 7 株, 另外由鴨分離到 8:A 及 9:A 血清型各 1 株。

討論

本試驗中將 84 株在台灣分離的 *P. multocida* 菌株進行生化性狀試驗, 所得的結果與 Chang⁽⁷⁾ 在 1982 年對台灣分離之家禽和豬由來菌株的生化試驗結果相同, 即菌株間有一致的生化性狀但對醣類發酵則有所差異。Rosenbusch 和 Merchant⁽²¹⁾ 曾將美國分離株依對 xylose、arabinose 及 dulcitol 之發酵作用將菌株分類為 Group I、Group II、Group III, 而本次試驗菌株對 xylose 不發酵, 對 ducitol 發酵, 但對 arabinose 僅有 88.1% 的發酵作用, 所以分類上較接近 Rosenbusch 的 Group I。即各地分離株之醣類發酵作用有所差異。Chang⁽⁷⁾ 報告 1970 年以前在

台灣分離菌株有一致之醣類發酵性, 在 1978 年以後分離者則性狀相異, 在本次調查中亦有類似結果, 分離菌株對 maltose、sucrose、arabinose 及 sorbitol 的發酵作用並不一致。

目前對 *P. multocida* 之血清學分類的方法有 Little 和 Lyon⁽¹²⁾ 的 plate agglutination 試驗、Carter^(3,4,5) 的 indirect hemagglutination 試驗、hyaluronidase decapsulation 試驗及 acriflavine 反應, Namioka^(14,16,17) 的 plate 和 tube agglutination 的試驗, 另外亦有 Heddleston⁽¹¹⁾ 的 gel diffusion precipitin 試驗, 根據 Brogden⁽¹⁾ 比較前述 4 種菌株血清型分類方法, 結果發現 4 種方法之間測定結果有差異性, 因為 *P. multocida* 之抗原性複雜, 所以常常在一血清型鑑定方法中僅 1 血清型, 但若在另一血清型鑑定法中卻出現多種血清型。

此次調查在本省由各種動物分離之巴氏桿菌血清型 111 株, 結果屬於 Heddleston 1:A 型的有 89 株, 3:A 型的有 16 株, 8:A 型 5 株 (豬 4 株、鴨 1 株), 9:A 1 株 (由鴨分離), 其中雞分離株 18 株全部屬於 1:A 血清型。顯示目前流行於台灣之巴氏桿菌, 尤其在禽類以 Heddleston 第 1 型為最重要, 第 3 型次之, 國外如以色列的 Mushin⁽¹³⁾ 亦報告由家禽所分離的家禽霍亂菌株以 1 型及 3 型為主, 佔了 58.1%~88.9%, 而 1 型的發生率又較 3 型為高, 在英國⁽⁸⁾ 及荷蘭⁽²⁴⁾ 亦有相似的報告。而 Namioka 與 Brunner⁽¹⁵⁾, Namioka 與 Murata⁽¹⁸⁾ 報告目前世界各地由家禽霍亂病例分離之血清型以 Namioka 血清型的 5:A、8:A、9:A 為主, 亦即相當於 Heddleston 1:A 及 3:A 血清型⁽¹⁾, 此與本調查所得之結果一致。1973 年 Chang⁽⁶⁾ 曾調查本省由鴨、雞及豬分離之 74 株巴氏桿菌菌株之 Namioka 菌體血清型, 發現其中 64 株為第 5 型, 3 株為第 1 型, 其餘 7 株未能鑑定, 1982 年 Chang⁽⁷⁾

再調查 103 株，發現 89 株為第 5 型，5 株為第 1 型，9 株無法鑑定，即台灣分離株之菌體血清型以 Namioka 第 5 型為主，少數為第 1 型，按 Namioka 第 5 菌體血清型即相當於 Heddleston 第 1 血清型⁽¹⁾，此與本調查之結果一致，而 Namioka 第 1 血清型相當於 Heddleston 第 4 型⁽¹⁾則在本調查中未發現，在本調查中佔次多數的 Heddleston 第 3 血清型係相當於 Namioka 血清型的第 2、4、8、9 型⁽¹⁾則未見於張之報告。

綜合本調查與 Chang^(6,7) 之調查結果可以發現本省巴氏桿菌仍以 Heddleston 第 1 型（即 Namioka 第 5 型）為最主要流行血清型，但是其他血清型亦有存在，並且一些以前在台灣未發現的血清型（8：A、9：A）在本調查中亦首次發現，由於流行菌株血清型的調查在防疫上非常重要，有必要對之繼續定期加以監測。

參考文獻

- Brogden KA, Packer RA. Comparison of *Pasteurella multocida* serotyping systems. *Am J Vet Res* 40 : 1332–1335, 1979.
- Brogden KA, Rhodes KR, Heddleston KL. A new serotype of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. *Avian Dis* 22 : 185–190, 1978.
- Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 16 : 481–484, 1955.
- Carter GR. Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *J Appl Microbiol* 24 : 162–163, 1972.
- Carter GR, Bain RVS. Pasteurellosis (*Pasteurella multocida*) : A review stressing recent developments. *Vet Rec Annot* 6 : 105–128, 1969.
- Chang CF. Serological and biochemical studies on *Pasteurella multocida* isolated in Taiwan. *Jour Vet Med Anim Husb* 22 : 33–38, 1973.
- Chang CF. *Pasteurella multocida* serotypes, biochemical characteristics and drug susceptibility isolated in Taiwan. *Taiwan Jour Vet Med Anim Husb* 40 : 47–52, 1982.
- Curtis PE. Serotyping British isolates of *P. multocida* from avian species. *Vet Rec* 99 : 256–257, 1976.
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. In "Yersinia, Francisella, Pasteurella, and Brucella", *Microbiology*, 4th ed, chapter 30 : 609–610, 1990.
- Heddleston KL. Physiological characteristics of 1, 268 cultures of *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* 37 : 745–747, 1976.
- Heddleston KL, Gallagher JE, Reberts PA. Fowl cholera : Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis* 16 : 925–936, 1972.
- Little PA, Lyon BM. Demonstration of serological types within the nonhemolytic *Pasteurella*. *Am J Vet Res* 4 : 110–112, 1943.
- Mushin R. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolants from poultry. *Avian Dis* 23 : 608–615, 1979.
- Namioka S. Serological studies on *Pasteurella multocida* especially on O-antigenic analysis of the organism, In "Microbiology and Immunology : Yersinia, Pasteurella, Francisella." Basel, Switzerland, Karger, Vol 2, 177–178, 1973.
- Namioka S, Bruner DW. Serological studies on *Pasteurella multocida*. IV. Type distribution of the organisms on the basis of their capsule and O groups. *Cornell Vet* 53 : 41–53, 1963.
- Namioka S, and Murata M. Serological studies on *Pasteurella multocida*. I. A simplified method for capsular typing of the organism. *Cornell Vet* 51 : 498–507, 1961.
- Namioka S, and Murata M. Serological studies on *Pasteurella multocida*. II. Characteristics of somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet* 51 : 507–521, 1961.
- Namioka S, Murata M. Serological studies on *Pasteurella multocida*. V. Some epizootiological findings resulting from O antigenic analysis. *Cornell Vet* 54 : 520–534, 1964.
- Rimler RB, Rhodes KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 25 : 615–618, 1987.
- Roberts RS. An immunological study of *Pasteurella septica*. *J Comp Pathol* 57 : 261–278, 1947.

21. Rosenbusch C, Merchant IA. A study of the hemorrhagic septicemia *Pasteurella*. Jour Bact 37 : 69–89, 1939.
22. Weaver RE, Hollis DG, Bottone EJ. *Pasteurella* species. In Lennete EH, Balows A, Hausler WJ, Jr. Shadomy HJ (eds) : Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. p321. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1985.
23. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, Hooper DC. *Pasteurella multocida* infections : report of 34 cases and review of the literature. Medicine 63 : 133, 1984.
24. Yadin H, Moraal LG. Serological typing of isolates of *Pasteurella multocida* from poultry and other animals in the Netherlands. Netherlands J Vet Sci 15 : 783–787. 1978.

Serological and biochemical studies on *Pasteurella multocida* isolated in Taiwan

*Yong-Siu LU, Hsiang-Jung TSAI, Chun-Sein TSENG, Dih-Fa LIN

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, 251 R.O.C.

SUMMARY In total, 111 isolates of *Pasteurella multocida* that were recovered from various avian species, pigs, cattle, and deer in Taiwan since 1970 were investigated. All 111 isolates were shown to be belonged to Carter's capsular serotyping type A. The results of Heddleston's somatic serotyping indicated that 80.2 % (89/111) of the isolates were of serotype 1, 14.4 % (16/111) were of serotype 3, 4.5 % (5/111) were of serotype 8, and 0.9 % (1/111) was serotype 9. According to animal species, one isolate of bovine origin was of 3 : A serotype ; one isolate from deer was of 1 : A serotype ; 14 isolates of swine origin were of 1 : A (2 isolates) ; 3 : A (8 isolates), and 8 : A (4 isolates) serotypes ; 95 isolates from various avian species (chickens, ducks, geese, turkeys, pigeons) were of 1 : A (86 isolates, 90.5 %), 3 : A (7 isolates, 7.4 %), 8 : A (one isolate, duck origin) and 9 : A (one isolate, duck origin) serotypes, of 84 isolates tested for their biochemical characteristics, all had uniform biochemical properties. All 84 isolates tested completely fermented galactose, glucose, mannose and mannitol. However, they showed varied fermentation reactions to other carbohydrates. The fractions of the isolates that fermented various carbohydrates were as follows : sucrose, 96.4 % ; arabinose, 88.1 % ; sorbitol, 33.3 % ; Maltose, 2.4 % . [* Lu YS, Tsai HJ, Tseng CS, Lin DF. Serological and biochemical studies on *Pasteurella multocida* isolated in Taiwan. J Chin Soc Vet Sci 20 (2) : 155 - 161, 1994. * Corresponding author TEL (02) 621-2111, FAX (02) 622-5345]

Key words: *Pasteurella multocida*, Capsular serotyping, Somatic serotyping, Carbohydrate fermentation

*Corresponding author

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