

家禽霍亂菌苗對雛鷄、鴨免疫效力之探討

蘇杰夫 黃文徹

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

選取國產家禽霍亂菌苗三廠，就其對小白鼠、雛鷄及鴨之免疫效力之探討，攻擊用之 *P. multocida* 的毒力，其敏感度以雛鴨最高、雛鷄次之、小白鼠最低，即標準株之 LD_{50} 對雛鴨為 $10^{-8.24}$ ，雛鷄為 $10^{-7.42}$ ，小白鼠為 $10^{-6.75}$ 。野外分離株對雛鴨為 $10^{-8.64}$ ，雛鷄為 $10^{-7.68}$ ，小白鼠為 $10^{-7.16}$ ，顯示野外分離株之毒力較強。各廠菌苗對供試動物之免疫效力，就穩定性及經濟效益上仍以小白鼠為較佳試材，若以現行檢定標準置換防禦指數，則最低須大於 0.8。另就本劑保存之有效期，最多只有半年之久。故若欲使其有效期延長僅有提高本劑之品質。

由 *Pasteurella multocida* 引起之家禽霍亂 (Fowl cholera) 係為一極激烈，高度致病之細菌性疾病⁽¹⁰⁻¹¹⁾，全世界各地自古迄今仍未見平息^(4-6, 8)，吾國更常有發生^(1, 3)，但實際報告仍不多，尤其目前國內鴨肉遽增，本病也相形增加。故應用菌苗以期防治本病之量也不斷的增加，惟當前吾國對該菌苗檢定標準上，仍以小白鼠之免疫力為主，至於其對禽類本身實際效力仍未臻理想，而致使消費者對菌苗之品質優劣存疑，因此在本菌苗檢定方法上有待檢討之必要。故擬定本計畫，是否對當前本菌苗檢驗法有必要修定之依據。

材料與方法

(一) 試驗材料：

1. 供試動物：

(1) 小白鼠：13 ~ 14 公克，本分所自產之

ICR 品系健康小白鼠。

(2) 雛雞：3 ~ 4 週齡，係東盈公司贈送之蛋用公雞。

(3) 雛鴨：1 ~ 2 週齡，由宜蘭地區購入。

2. 供試菌苗：

國內藥廠出品之家禽霍亂不活化菌苗共三廠，每廠各選出一批。同時該批菌苗分別保存，3、6 個月時進行保存效力測試。

3. 攻擊用菌株：

(A) 標準株：係本分所檢定用菌株。

(B) 野外株：係由罹患本症之病鴨分離之野外菌株，由國立屏東技術學院張照夫教授分離。

(二) 試驗方法：

1. 實驗動物之免疫：

選定國產之本劑菌苗共三批，依檢定

標準或原劑之用法用量對小白鼠、雞、鴨進行免疫注射，其量小白鼠為皮下 0.2 ml，雞、鴨為肌肉 0.5 ml。

2. 攻擊菌株之毒力測定：

以攻擊菌株 *P. multocida* 經 37 °C，18~20 小時培養後，以培養液再稀釋成 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ ($10^0 \cong 2.7 \sim 3.1 \times 10^9$ CFU/ml)，將其 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 稀釋階之稀釋菌液分別接種上述供試動物，以測定其 LD₅₀ 及 MLD。

3. 菌苗對供試動物之免疫效力：

經本菌苗免疫後之小白鼠、雞、鴨於 2、3、4 週時分別以 *P. multocida* 菌攻擊，並飼養觀察二週，記錄其斃死隻數。

4. 受測菌苗分置於 3 及 6 個月後對小白鼠之

力價測定：

將受測之 3 批菌苗，分置於 10 °C 保存，3 及 6 個月後再依現行之檢定標準，對小白鼠免疫，並經 *P. multocida* 攻擊。

結 果

一家禽霍亂菌對小白鼠、雞及鴨之毒力探討：

P. multocida 經 37 °C，18 小時培養之活菌對供試動物之 LD₅₀ 及 MLD 之測定如表一，標準株之 LD₅₀，對雞鴨為 $10^{-8.24}$ ，雞為 $10^{-7.42}$ ，小白鼠為 $10^{-6.75}$ ；野外分離株對雞鴨為 $10^{-8.64}$ ，雞為 $10^{-7.68}$ ，小白鼠為 $10^{-7.16}$ ，而 MLD 則不論標準株或野外分離株，對小白鼠皆為 $10^{-7.0}$ ，雞為 $10^{-8.0}$ ，鴨為 $10^{-9.0}$ ，顯示雞鴨之病原

表一 *P. multocida* 對小白鼠、雞及鴨之毒力測定

動物別	攻擊菌株別	菌液濃度 *	死亡數/攻擊數	LD ₅₀	MLD
小白鼠	標準株	10^{-6}	9/10	- 6.75	- 7.0
		10^{-7}	4/10		
		10^{-8}	0/10		
		10^{-9}	0/10		
	野外株	10^{-6}	10/10	- 7.16	- 7.0
		10^{-7}	6/10		
		10^{-8}	0/10		
		10^{-9}	0/10		
雞	標準株	10^{-6}	10/10	- 7.42	- 8.0
		10^{-7}	7/10		
		10^{-8}	2/10		
		10^{-9}	0/10		
	野外株	10^{-6}	10/10	- 7.68	- 8.0
		10^{-7}	8/10		
		10^{-8}	4/10		
		10^{-9}	0/10		
鴨	標準株	10^{-6}	6/6	- 8.24	- 9.0
		10^{-7}	5/6		
		10^{-8}	4/6		
		10^{-9}	1/6		
	野外株	10^{-6}	6/6	- 8.64	- 9.0
		10^{-7}	6/6		
		10^{-8}	5/6		
		10^{-9}	2/6		

註 * $10^0 \cong 2.7 \sim 3.1 \times 10^9$ CFU/ml

性最具敏感。

三家禽霍亂菌對家禽霍亂菌苗免疫動物之效力測定：

選取國產家禽霍亂菌苗3批，分別依其用法及用量對小白鼠、雛雞及雛鴨等供試動物免疫注射後，經2、3、4週再分別以 *P. multocida* 標準及野外分離株攻擊，其結果如表二～四所示，不論何種供試動物，在免疫效力上依防禦指數或防禦率，3批受測檢體，若以現行的檢定標準之60%防禦力為基準，則小白鼠之防禦指數為0.82～0.84，雛雞為0.60～0.66，雛鴨為0.62

～0.93，顯示以小白鼠之防禦指數範圍較窄，也即較穩定。另免疫後以 *P. multocida* 攻擊，以免疫後第3週攻擊之效果較佳。

三家禽霍亂菌苗經3及6個月保存後對小白鼠之免疫效力：

將受測之家禽霍亂菌苗保存於4～10℃，經3、6個月後，就其對小白鼠的免疫效力之測試，如表五所示，A品僅能維持3個月，B品則6個月尚能維持至最低的檢驗標準，而C品仍為不合格。

表二 家禽霍亂菌苗免疫小白鼠對 *P. multocida* 攻擊之防禦效力：

組 別	菌 苗 別	菌苗免疫後週數	免 疫 效 力	
			防禦指數 *	防禦率(%) **
標準菌株	A	2	0.84	60
		3	0.82	60
		4	0.84	60
	B	2	1.05	70
		3	1.22	90
		4	1.05	80
	C	2	0.48	50
		3	0.55	50
		4	0.44	40
野外菌株	A	2	0.68	50
		3	0.84	60
		4	0.82	60
	B	2	1.05	70
		3	1.19	80
		4	1.16	80
	C	2	0.48	40
		3	0.55	50
		4	0.46	40

* 防禦指數係供對照組之 LD_{50} - 免疫組之 LD_{50} 。

** 防禦率係以10MLD攻擊之存活率

表三 家禽霍亂菌苗免疫雞對 *P. multocida* 攻擊之防禦效力

組 別	菌 苗 別	菌苗免疫後週數	免 疫 效 力	
			防 禦 指 數 *	防 禦 率 (%) **
標 準 菌 株	A	2	0.51	50
		3	0.65	60
		4	0.60	60
	B	2	0.92	70
		3	1.13	80
		4	0.92	70
	C	2	0.34	40
		3	0.41	50
		4	0.39	40
野 外 菌 株	A	2	0.49	50
		3	0.66	60
		4	0.47	50
	B	2	1.00	70
		3	1.10	80
		4	0.91	70
	C	2	0.33	30
		3	0.41	50
		4	0.34	40

表四 家禽霍亂菌苗免疫鴨對 *P. multocida* 攻擊之防禦效力

組 別	菌 苗 別	菌苗免疫後週數	免 疫 效 力	
			防 禦 指 數	防 禦 率 (%)
標 準 菌 株	A	2	0.53	50.0
		3	0.85	66.6
		4	0.40	50.0
	B	2	0.89	66.6
		3	1.00	83.3
		4	0.93	66.6
	C	2	0.29	33.3
		3	0.47	50.0
		4	0.40	50.0
野 外 菌 株	A	2	0.47	50.0
		3	0.62	66.6
		4	0.48	50.0
	B	2	0.88	66.6
		3	0.93	66.6
		4	0.76	66.6
	C	2	0.28	33.3
		3	0.40	50.0
		4	0.27	33.0

表五 家禽霍亂菌苗保存3及6個月後對小白鼠之免疫效力

菌苗別	保存時間	防禦率(%)
A	3	60
	6	50
B	3	70
	6	60
C	3	50
	6	30

討 論

就家禽霍亂菌 *P. multocida* 之新鮮活菌株對小白鼠、雛雞及鴨等實驗動物評估，顯現該菌對小白鼠之致病之敏感度較弱且穩定^(9, 12)；惟菌株若經長期繼代，則其毒力有減弱之勢，此即因人工培養繼代致使莢膜消失，影響起病性⁽⁷⁾，故野外分離株與當前檢定用標準株在毒力上稍見差異。因此菌株應以凍結乾燥保存法較具確實。又本菌株對實驗動物之病原性，以禽類較強，既使10個菌數仍可使供試動物致死，而小白鼠對 *P. multocida* 之感受性雖高，但仍須較適當量的程度，100個菌數方能致病死亡，此符合波岡與谷口氏⁽⁷⁾ (1982)的論點，然因 *P. multocida* 對小白鼠之毒力穩定範圍較廣，故筆者仍認為家禽霍亂菌苗之檢定上仍維持原有之檢定法，使用小白鼠為檢定材料較受，而攻擊量也以MLD較寬鬆。

家禽霍亂菌苗對小白鼠、雛雞及鴨的免疫效力，就其對小白鼠的免疫效力而言，若依現行60%之防禦率為基準，則其防禦指數須大於0.8始可通過，且高防禦率者，如90%，其防禦指數即高達1.20，故若依現行之防禦率改換防禦指數計算的話，則必須大於0.8之最低標準。若依雛雞之免疫力，而最低之防禦率標準如也訂為60%時，其防禦指數必須大0.6。但如以雛鴨之免疫力供為試材，其防禦率於66.6%時之防禦指數為0.62以上，但其防禦指數幅度甚大，為0.62~0.92，故

據本項試驗結果，其穩定性分別依小白鼠、雛雞、雛鴨排列，又不論何種供試動物，經本劑免疫後，於第三週攻擊之效力較高，故攻擊之時間仍可左右其檢驗成績，又於經濟效益及供試動物飼養管理上，仍以小白鼠做為試驗材料較適合⁽⁹⁾。

家禽霍亂菌苗之有效期限，仍取決於品質之優劣，於受測之第三批菌苗，於受檢第一個月至第三個月之免疫效力仍可維持原有成績，但至第六個月其效力即有降低之趨勢，因此本劑之有效期甚短，優良品僅半年之久，劣品也僅能維持三個月。故此之所以經本所檢定合格之成品，往往田間使用上不能達到理想之免疫效果，因其穩定有效期所致，然張氏⁽¹⁾ (1982)曾就台灣禽畜 *P. multocida* 之特性分類，得知禽類大致以5A型較多，故生物藥品廠，在製作家禽霍亂菌苗上須隨時注意疫情變化，掌握時機，以較普遍菌型為原種株，製成菌苗較合實際。另張氏等⁽²⁾ (1983)曾就活菌，以2次飲水投與免疫，經 *P. multocida* 強毒攻擊，可有87.5~95%之耐過率，其效果可說超越死菌苗，故為防範本病之發生活菌苗仍有待開發。

參 考 文 獻

1. 張照夫。1982。禽畜敗血性出血性巴氏桿菌之特性，台灣畜牧獸醫學會會報，四十期 47 - 52。
2. 張照夫、尤碧艷、王琴玲。1983。飲水投與 *P. multocida* 活菌對鴨霍亂之免疫效果，台灣省畜牧獸醫學會72年度春季學術研討會，論文宣讀 11，台灣省畜牧獸醫學會公報 42 - 121。
3. 羅浴沂、賴棟明、康錫乾、吳靜芝、吳龍泰。1987。宜蘭縣種鴨禽病血清學調查，台灣畜牧獸醫學會會報，四十九期 71 - 82。
4. 小茂田匡央、系井浩、山田勤、南山治美、水谷富哉、小泉俊二。1989。採卵雞に發生した *Pasteurella multocida* 感染例，雞病研報 25 : 132 - 138。

5. 沢田拓士。1988。家禽コレラ，雞病研報 24：99 - 110。
6. 界外昇、杉本譽文、榊原秀夫、森昌昭、岡村雅幸、山中進吾、庄山重好。1990。肉鶏に發生した *Pasteurella multocida* 感染症，雞病研報 26：135 - 139。
7. 波岡茂郎、谷口稔明。1982。家禽コレラ，雞病診斷（堀内貞治等編），家の光協會，日本・東京 391 - 402。
8. 稻垣靖子、前田卓也、安藤正樹、中村實、小林元昭、吉田健一、大塚正男、沢田拓士。1986。採卵雞から分離された *Pasteurella multocida* の病原性，雞病研報 22：155 - 162。
9. Code of federal regulatins. No 9. 1986 Animal and Animal products The National Archives of the United States. Washington D.C. USA.
10. Carter GR 1955: Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types Amer. Jour. Vet. Res. 16: 481-484.
11. Chen C. 1970. reciprocal immunogenicity among the various anti-fowl cholera serum strains. Abstracts of the 6 1st scientific seminar of Taiwan Prov Res. Inst. Anim Health. 1.
12. Yaw K.E. Brietman L & Kakavas J.C. 1956: A comparison of virulence for mice and chickens of different colonial Variants of the tgree seroglogical type of *pasteurella mutocida*. Amer. Jour. Vet. Res. 17: 157-161.

Study on Potency of Fowl Cholera Bacterins in Chicks and Ducklings

J.F. Su, W.C. Hwang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
The Branch Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY

Three native bacterins against *Pasteurella multocida* (PM) were tested for potency in chicks and ducklings. The sensitivity in duckling challenged by live PM was the highest, followed by chick and then mouse. The 50% lethal dose (LD_{50}) of the group challenged with standard strain of PM were $10^{-8.24}$ (duckling), $10^{-7.42}$ (Chick) and $10^{-6.75}$ (mouse); and that of the group challenged with field strain of PM was $10^{-8.64}$ (duckling), $10^{-7.68}$ (chick) and $10^{-7.16}$ (mouse), respectively. Above result shows that the toxicity of field strain of PM is slightly higher than standard strain of PM.

After the trials of three commercial bacterins, it seemed that the mouse was the best suitable among 3 experimental animals in its stability and cost for the potency test. The protective index of mice should be larger than 0.8 by using the protective index to substitute the current standard of inspection. The effective storage time of above bacterins is less than 6 months. So, if we want to prolong the expiration time, the best is to improve the quality of the bacterin itself.