

猪胸膜肺炎嗜血桿菌脂多醣之定性

26-7

張惟茗¹ 楊喜吟¹ 賴秀穗²

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 國立台灣大學獸醫學系

以石炭酸抽取之猪胸膜肺炎嗜血桿菌 (*Haemophilus pleuropneumoniae*, HP) 第一血清型脂多醣內毒素，發現它不具溶血能力，Limulus amoebocyte lysate (LAL) test 及 Dermal Shwartzman reaction 均為陽性反應。混合 D-galactosamine 腹腔注射小白鼠之 LD₅₀ 為 8.9 mg。以銀染色所得之電泳圖呈梯狀平滑型脂多醣型態，Coomassie blue 染色則沒有蛋白質痕跡。與同型抗全菌高免血清作用進行免疫擴散沉澱反應，得一主要及一次要具血清型特异性之二條免疫沉澱線，並且在 HP 可溶性抗原中可測得高量此種脂多醣抗原。天竺鼠氣管接種脂多醣內毒素後，會引起局部、瀰漫性支氣管肺炎、鬱血及出血，炎症細胞浸潤以嗜中性球及巨噬細胞為主，並且產生一種紡錘形、核濃染細胞增生。病變與活菌氣管接種於天竺鼠所產生的病變類似。以脂多醣內毒素免疫小白鼠進行保護實驗，則保護效果遠較全菌抗原好。

猪嗜血桿菌猪胸膜肺炎是一種由胸膜肺炎嗜血桿菌 (*Haemophilus pleuropneumoniae*, HP) 所引起的猪之壞死性、出血性、纖維素性胸膜肺炎。臺灣在1975年首次爆發以來⁽¹⁰⁾，目前也已蔓延全省，成為引起猪呼吸道疾病中最主要病原菌之一。在1981年所作的生長肥育猪肺炎病原菌調查中，發現以 HP 感染為主⁽¹⁾。流行於本省之菌株原本只是單純的第5型，但是目前已有1, 2, 3, 7 和8等血清型的相繼侵入⁽²⁾，而以病原性最強的第1型為

主要⁽⁹⁾，菌型的複雜化更增加本病防治上的困難。本病之產生主要是藉空氣傳播，常為急性或亞急性，各年齡猪隻均會受感染，但是一般以3月齡受害最大^(5, 17)。目前雖然對於猪感染HP的確實機制尚未完全瞭解，但是由臨床病徵和病理變化都顯示細菌毒素可能參與作用^(4, 15)。由感染所造成的主要病變如出血、水腫、栓塞及纖維素性滲出物等，均顯示血管系統是主要受攻擊器官，而這些似乎是由內毒素所引起⁽¹⁸⁾。本實驗之目的即在於抽取HPP

之脂多醣作系列之定性，以了解其在抗原性及病原性所扮演之角色。

材料與方法

細菌培養及脂多醣之製備：

以白金耳將HP第一血清型菌接種在含5%脫纖馬血巧克力培養基上，37°C、5% CO₂恆溫箱下培養18個小時。收取的菌體在以PBS沖洗三次後，加入最終濃度為0.3%的福馬林37°C、1小時不活化處理。菌體脂多醣之抽取係採用phenol-water法⁽²⁰⁾抽取，然後作以下一系列分析。醣類的定量採Dubois的比色法⁽⁶⁾。

HP第一型菌抗血清之製備：

抗血清之製備係使用12週齡兔子來免疫。取0.5 ml、10%之不活化菌體懸浮液與等量佛氏完全佐劑充分混合後，肌肉注射免疫。二週後同量菌體再與佛氏不完全佐劑充分混合後作第二次免疫。一週後，每隔三天以1 ml同濃度菌體不含佐劑作補強免疫共四次。最後一次免疫抗原量為2 ml，並在兩天後放血分離血清。HP第2~9型之兔抗全菌高免血清，則由台糖畜產研究所張靖男博士惠賜。

溶血試驗：

將抽取之脂多醣樣品以PBS作2倍連續稀釋後，每稀釋倍數取0.5 ml加入等量之1%馬紅血球懸浮液，置於37°C、2小時後再轉放於4°C、18小時後判定，大於50%溶血者為陽性⁽¹⁴⁾。

Limulus amoebocyte lysate (LAL) test

LAL test是用來測定內毒素活性。本試驗是使用商品化之試驗套組-Pyrotell。方法是將欲測樣品以無熱原蒸餾水作10倍稀釋，再將各稀釋倍數取0.2 ml加入含LAL試管內，37°C、1小時後判定。陽性對照為E. coli 0110:B4株之脂多醣，陰性對照是無熱原蒸餾水。

Dermal Shwartzman reaction：

將抽取之脂多醣樣品以蒸餾水作10倍稀釋後，取不同稀釋倍數0.2 ml皮內接種於12週齡兔子之腹部皮膚。24小時後，靜脈注射入50 µg的E. coli 0110:B4株的脂多醣，

6小時後觀察皮膚接種部位壞死情形。有壞死者為陽性反應，反之為陰性。陽性對照為E. coli 0110:B4株之脂多醣，陰性對照是無熱原蒸餾水。

脂多醣對小白鼠之毒性試驗：

取70隻8週齡小白鼠分成6組實驗組和1組對照組分別取0.25 ml不同稀釋倍數的脂多醣樣品及無熱原蒸餾水，混合15 mg(溶於0.25 ml蒸餾水)的D-galactosamine共0.5 ml腹腔接種於小白鼠，24小時後觀察死亡情形⁽⁶⁾。

SDS-PAGE電泳及銀染色：

SDS-PAGE所用的方法係依照Laemmli之方法⁽¹²⁾。將抽取之脂多醣樣品30 µl溶於樣品緩衝液中，煮沸5分鐘，再將樣品加入預先準備之10%板膠(slab gel)，以定電流25 mA進行分離。約4小時電泳後，取下板膠作Coomassie blue R-250染色和銀染色。銀染色法是依照Tsai⁽¹⁹⁾之方法。

免疫電泳及雙向免疫擴散試驗：

將泡於Tris-barbital緩衝液之1% agarose在煮沸之水浴槽中溶解後，將4.5 ml之agarose倒在6×1.5 cm之預先處理好之玻璃平板上，室溫下水平放置，冷卻後打洞加入抗原，以50 V定電壓電泳約一小時。加入HP第一型抗血清後，置於37°C、48小時後觀察。雙向免疫擴散試驗是在直徑9 cm平皿中加入上述1% agarose 15 ml，以打洞器打洞後分別加入抗原和抗血清置於37°C、48小時後觀察。使用的抗原為菌體可溶性抗原(溶於PBS)和抽取之脂多醣樣品，抗血清為HP為1~9型抗血清。

HP第一型不活化全菌抗原及脂多醣抗原之免疫力試驗：

取約八週齡58隻小白鼠分成4組實驗組和2組對照組。第1, 2組免疫全菌抗原(10⁸ CFU/ml)，第3, 4組免疫抽取之脂多醣抗原組免疫全菌抗原(1.2×10⁸ EU/ml)，對照組則注射PBS。所有免疫抗原均混合等量佛氏佐劑，以腹腔注射。第一天及第十四天各免疫一次，第二十一天再分別以10⁸ CFU/ml(第1, 3, 5組)及10⁸ CFU/ml(第2

, 4, 6 組) 之 HP 第一型活菌, 腹腔接種攻擊。斃死之小白鼠並作細菌之分離鑑定。

HP 第一型活菌及脂多醣對天竺鼠之病原性實驗:

將 30 隻天竺鼠, 分成 9 個實驗組及一個對照組, 每組各 3 隻。分經氣管接種活菌(10^8 CFU/ml)、抽取之脂多醣樣品(10^8 EU/ml) 及 PBS。將天竺鼠以乙醚麻醉後, 再氣管接種 1 ml 接種液, 對照組在接種後第二天撲殺, 接種活菌組及脂多醣組(各四組)則在接種後 1, 2, 3 及 7 天撲殺, 作剖檢並觀察病理變化。

結 果

以石炭酸抽取之脂多醣分子雖對馬紅血球不具溶血能力, 但是在 LAL test 所測得的內毒素活性為 2.5×10^8 EU/ml, Dermal Shwartzman reaction 他呈陽性反應, 混合 15 mg D-galactosamine 後的 HP 脂多醣腹腔注射小白鼠的 LD_{50} 為 8.9 mg。對照組則全數存活。

脂多醣經 SDS - PAGE 電泳分離後, 該板膠再以銀染色法染色, 結果發現所得之電泳圖呈梯狀平滑型脂多醣型態如圖 1, 以 Coomassie blue R-250 則染不出任何蛋白質成

份。以雙向免疫擴散試驗分析, 脂多醣只能和同型抗全菌高免血清反應形成兩條免疫沉澱線(具血清型特異性)如圖 2, 表示它是由兩類抗原所組成(主要與次要), 並且是構成可溶性抗原之主要部份(圖 3)。可溶性抗原則形成三條沉澱線, 且不具血清型特異性(圖 4)。因此不活化全菌在緩衝液裏會流失可溶性抗原, 而此可溶性抗原含大量脂多醣抗原經免疫電泳分析, 發現它會產生 2 條不具 spur、呈長“W”狀的沉澱線如圖 5。在 Hp 第一型不活化全菌抗原及脂多醣抗原之免疫力試驗中攻擊菌量為 10^8 CFU 者, 以全菌抗原免疫之小白鼠存活率為 40% (4/10)。免疫脂多醣組之存活率為 88.89% (8/9), 對照組則為 20% (2/10)。以 10^8 CFU 活菌攻擊則除了 LPS 抗原免疫組有一隻存活外, 其餘各組全數死亡。攻擊之活菌可從斃死小白鼠之肺臟回收。由以上結果可知脂多醣抗原的保護能力遠較全菌抗原為優。

在 HP 第一型活菌、脂多醣內毒素及類內毒素對天竺鼠之病原性實驗中, 對照組除了局部有輕微間質性肺炎外, 無其它有義意之病理變化。而活菌接種組, 在接種後第 1 天剖檢者可見局部性支氣管肺炎、鬱血、肺泡輕度壞死。炎症細胞增生, 主要是以巨噬細胞及嗜中性

表一 HP 第 1 型活菌及脂多醣氣管接種天竺鼠所引起之病理變化

Inoculum	induced lesion	day*	exudate	haemorrhage(H) or congestion(C)	cellular infiltration			
					M ¹	N ²	E ³	L ⁴
live bacteria	local, extensive bronchop- neumoniae	1	++	C +	+	++	++	+
		2	+	-	++	++	++	+++
		3	-	H ±	+	+	++	+
		7	-	-	+	±	+	+
lipopoly- saccharide	local, extensive bronchop- neumoniae	1	+	C ++	++	++	+	--
		2	+	H +	+++	+	+	+
		3	±	H ++	+	+	+	++
		7	-	-	++	-	±	+

* Three G.P.S were tested in each day

1. M: macrophage 2. N: neutrophil 3. e: eosinophil 4. L: lymphocyte



圖1 HP 第1型脂多醣以銀染色之 SDS-PAGE圖譜：
 (1)為 E. COLI OLLL: B 4 株之脂多醣。
 (2)為 HP 第1型脂多醣。

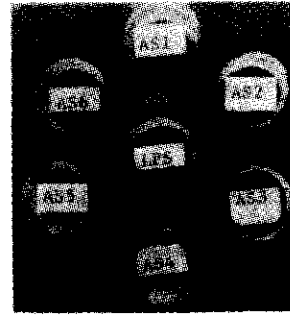


圖2 HP 第1型脂多醣抗原與抗HP 第1~6型血清之雙向免疫擴散試驗。(LPS):為HP第1型脂多醣。(AS1~6):分別為HP第1~6型之抗血清。

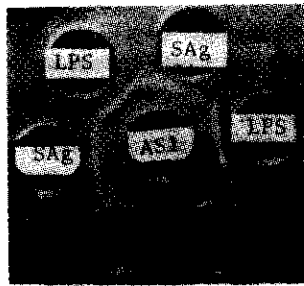


圖3 HP 第1型脂多醣、可溶性抗原與HP 第1型抗血清之雙向免疫擴散試驗。(LPS):為HP第1型脂多醣。(SAg):為HP第1型可溶性抗原。(AS1):為HP第1型抗血清。

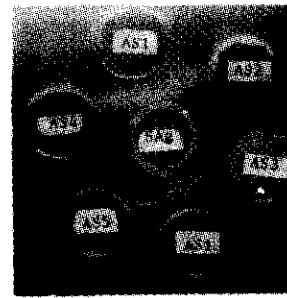


圖4 HP第1型可溶性抗原與 HP 第1~5型抗血清之雙向免疫擴散試驗。(SAg):為HP第1型可溶性抗原。(AS1~5):分別為HP第1~5型之抗血清。

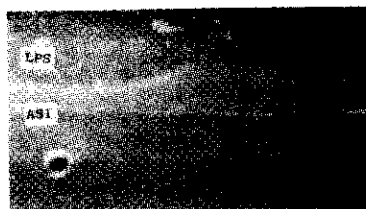


圖5 HP 第1型脂多醣抗原與同型抗血清之免疫電泳試驗。(LPS):為HP第1型脂多醣抗原。(AS1):為HP第1型抗血清。

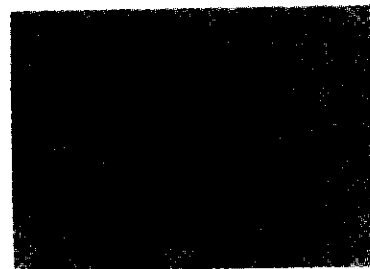


圖6 天竺鼠經氣管接種HP第1型脂多醣一天後肺臟產生長梭狀、核濃染細胞之增生。

球為主，其它還有淋巴球及嗜酸性球。除了肺臟外其它臟器沒有明顯病變。接種後第2天剖檢者，炎症細胞數量及分布較第1天剖檢者多且廣，仍是以巨噬細胞及嗜中性球為主。肺泡腔及部分小支氣管腔致炎症細胞占據。第三天剖檢者，病變及炎症細胞相與第1, 2天類似，但較輕微。第7天剖檢者，可見淋巴小節（Lymphatic nodule）明顯增生，肺泡壁也有增生情形。炎症細胞仍以巨噬細胞為主，嗜中性球量減少。脂多醣接種組在接種後第1天剖檢者亦可見局部性支氣管肺炎、明顯鬱血。以嗜中性球巨噬細胞為主的炎症細胞浸潤，伴隨淋巴球及嗜酸性球。此外有紡錘形、核濃染細胞增生，且有形成漩渦狀排列之趨勢（圖6）。除了肺臟外其它臟器沒有病變產生。接種後第2天剖檢者，有輕微出血及小區域壞死，肺泡細胞增生，淋巴小節也有增生現象。炎症細胞浸潤仍以巨噬細胞及嗜中性球為主。第三天剖檢者出血更嚴重，肺泡細胞及淋巴小節增生。炎症細胞相一樣，但淋巴球明顯增加。此外紡錘形、核濃染細胞增生仍可見到。第7天剖檢者，沒有鬱血、出血情形。有小區域壞死，肺泡細胞增生，腔內細胞溶解。炎症減輕，只見巨噬細胞少量嗜酸性球（表1）。

討 論

在本實驗中抽取的脂多醣以銀染色所得之電泳圖呈梯狀，是典型的平滑型脂多醣型態（圖1）。在LAL test、Dermal Shwartzman reaction 及對小白鼠的毒性試驗均為陽性反應，表示其具內毒素及過敏原活性。

在雙向擴散及免疫電泳實驗中，發現脂多醣是由二類抗原所組成，並且具有相同抗原性（圖2、圖5），且是可溶性抗原的主要部分。這也佐證了不活化全菌在緩衝液裡會流失可溶性抗原，而可溶性抗原含大量脂多醣分子。因此過分地沖洗可能會影響不活化全菌的保護效果，但是不經沖洗又可能有由內毒素所引起之毒性反應。在以小白鼠為模式所進行的免疫力實驗中，脂多醣的免疫效果遠較不活化全菌抗原來得好，因此脂多醣是重要的保護抗原。但是由於脂多醣本身即具內毒素和過敏原活

性，做為免疫抗原引起之副作用必定很大，因此尚需予與減毒處理。本實驗中不活化全菌抗原效力差的原因可能係由於在連續繼代及沖洗過程中，使菌體抗原流失所致（9, 13）。

在HP 活菌及脂多醣對天竺鼠之病原性試驗中，對照組只引起輕微間質性肺炎，而其餘二者卻造成極嚴重之病變。接種活菌與接種脂多醣所產生的病變非常類似，均會引起局部瀰漫性支氣管肺炎、鬱血、肺泡上皮細胞壞死、脫落、肺泡及支氣管腔被炎症細胞充滿、淋巴小節增生、及以巨噬細胞和嗜中性球為主的大量炎症細胞浸潤等。病程均在第二、三天最為嚴重。另外在豬感染HP 的特徵病變之一是紡錘形、核濃染細胞呈漩渦狀排列，接種脂多醣一天以後的天竺鼠肺臟也有發現（圖6），因此這類不明來源細胞的增生可能和脂多醣有關。有實驗顯示脂多醣分子很容易穿入正常呼吸道上皮（16），由於豬對內毒素感受性很高，在HP 感染時釋出的脂多醣可能會穿透呼吸道上皮，而引起肺炎及休克（7）。此外 Jensen 比較了第5型的強毒株及弱毒株，發現前者比後者每克乾重多了10 mg 的脂多醣（11）。因此脂多醣在HP 的病原性上可能扮演著重要的角色。

參 考 文 獻

1. 張靖男、沈詠梅、鍾文彬、嚴家清。1981。生長肥育豬肺炎細菌學之研究。台糖畜研所69/70 年期研究試驗報告：181-188 頁。
2. 張靖男、沈詠梅。1986。本省胸膜肺炎嗜血桿菌新血清型菌株之分離與鑑定。臺灣省畜牧獸醫學會75 年度秋季學術演講會摘要。17 頁。
3. 張靖男、沈詠梅、俞寶華。1987。各種化學治療劑對豬胸膜肺炎嗜血桿菌之抗菌效果。台糖畜研所75/76 年期研究試驗報告。129-137 頁。
4. Bendixen, P.H., P.E. Shewen, S. Rosendal, et al. 1980. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophage, peripheral blood monocyte and testicular

- cells. *Infect. Immun.* 33:673-676.
5. Davidson, J.N. and J.M. King. 1980. An outbreak of HP pneumonia in pigs. *Cornell. Vet.* 70: 360-364.
 6. Dubois, M. et al. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem.* 28(3): 350-356.
 7. Fenwick, B.W., B.I. Osburn and J. H. Olander. 1986. Isolation biological characterization of two LPS and a capsule-enriched polysaccharide from HP. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1433-1441.
 8. Galanos, C. et al. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76(11):5939-5943.
 9. Gunnarson, A. 1979. Evaluation of different antigens in the complement fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine. *Am. J. Vet. Res.* 40(11): 1564-1567.
 10. Hsu, F.S., C.N. Wang, N.Y. Chou and J.W. King. 1976. An epizootic of *Haemophilus parahemolyticus* pneumonia in swine. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* 6: 19.
 11. Jesen, A.E. and T.A. Betram. 1986. Morphological and biological comparison of virulent and avirulent isolations of HP serotype 5. *Infect Immun.* 51(2): 419-424.
 12. Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680-685.
 13. Lombin, L.H., S. Rosendal and W. R. Mitchell. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumoniae of swine caused by HP. *Can. J. Comp. Med.* 46: 109-114.
 14. Nakai, T., A. Sawata and K. Kume. 1983. Characterization of the hemolysin produced by HP. *Am. J. Vet. Res.* 44(2): 344-347.
 15. Rosendal, S., W.R. Mitchell, M. Weber. 1981. Haemophilus pleuropneumoniae lung lesions induced by sonicated bacterial and sterile culture supernatant. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong.* 221.
 16. Schwartz, J. et al. 1972. The passage of tritiated bacterial endotoxin across intact gingival cervical epithelium. *J. Periodontol.* 43: 270-272.
 17. Sebunya, T.N.K. and J.R. Sanders. 1983. HP infection in swine: A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182(2): 1331-1337.
 19. Tsai, C.M. and C.E. Fgasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting LPS in PAGE. *Anal. Biochem.* 119:115-119.
 20. Westphal O. and K. Jann. 1965. Purification of bacterial cell wall polysaccharides. In: RL Whistler, ed. *Method in carbohydrate chemistry*. Vol. V. New York: Academic Press, Inc. 83-110.

CHARACTERIZATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE EXTRACTED FROM HAEMOPHILUS PLEUROPNEUMONIAE

Chang Wei Ming¹, S.Y. Yang¹ and Shioh-Suey Lai²,

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
2. Department of Veterinary Medicine. National Taiwan University.

Summary

The phenol-extracted lipopolysaccharides (LPS) gave a positive reaction both in Limulus amoebocyte lysate (LAL) test and dermal Shwartzman reaction, but not in hemolysis test. The SDS-PAGE pattern of extracted LPS revealed by silver stain showed a ladder form and was considered as a smooth type of LPS pattern. The LD₅₀ of LPS was 8.9 mg in mice when intraperitoneally injected with D-galactosamine. It was also found that the soluble antigens of HP contained large amounts of LPS antigen. Two immunoprecipitation lines of LPS which were serotype-specific were observed when antiserum against homologous serotype of HP was used in double immunodiffusion test. Intratracheal inoculation of LPS into guinea pigs induced congestion and haemorrhage of lung. Histopathologically, extensive bronchopneumonia and aggregation of spindle, pyknotic cells were observed. The lesions induced by LPS in guinea pigs were similar to those induced by live HP inoculation. The immunogenicity of LPS was tested by using mouse protection test. The experimental data indicated that LPS antigen gave a good protective rate.

Reprinted from the J. Chinese Soc. Vet. Sci., 15:47-53, 1989.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Tamsui, Taiwan. R.O.C.
2. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taiwan. R.O.C.