

# 應用不同血清學反應法對豬嗜血桿菌 菌苗免疫效力之評估

蘇 杰 夫

台灣省家畜衛生試驗所

為尋求A. pleuropneumoniae 感染症之確實簡便診斷方法，以供菌苗檢定及應用效果之評估且診斷上能迅速把握防疫的時機。將A. pleuropneumoniae 之 I、II 及 V 型菌製成 Complement-fixation (CF)、Tube agglutination (TA) 及 Latex agglutination (LA) 血清反應抗原，證實該等抗原皆有良好之特異性，但以 LA 較為簡便。另就各種不同之菌苗對實驗室八週齡小豬行免疫注射，僅二週間隔補強豬方可耐過 A. pleuropneumoniae ( $10^9$  CFU/ml, 3 ml 鼻腔內接種) 之攻擊，血中抗體於攻擊時 (第一次免疫四週)，CF 僅 4~8 倍，TA 與 LA 皆為 8~32 倍，且 8 倍以上抗體有耐過活菌攻擊能力。又田間豬隻經不活化菌苗免疫後之抗體消長，仍以補強組抗體較具持續性且高力價，第 8 週達高峯，分別有 CF 17.75~19.69; TA 28.84~33.12 及 LA 20.39~28.84 之幾何平均值抗體。故防疫上應以菌苗二次之免疫方可得較理想之免疫力。

豬隻之 Actinobacillus (Haemophilus) Pleuropneumoniae (AP) 引發甚急性或急性之胸膜肺炎，吾國自 1976 年首由翁氏等<sup>(1)</sup> 報告 V 型菌以來，迄今全國各地因本症之污染更趨複雜，除 V 型外，I、II 及其他菌型也相續被證實<sup>(2)</sup>，對本症防疫上增加不少困擾且豬嗜血桿菌除對豬隻引起急性呼吸器症狀外，對感染豬隻常致併發其他疾病，轉為慢性病，致使對飼料之利用率降低，就目前企業化養豬，講求經濟成本情況下，對本症之防治措施上相當的重要，雖然目前飼料中可添加磺胺劑、抗生素或其他細菌抑制劑，以控制豬體內微生物之增殖，藉以防止疾病發生而促進生長，

但科技的提升，人類生活也隨之改進，對攝取之食品品質也跟著重視，因此肉品內殘留之藥物也成為食肉品質優劣的要件，前曾因輸日豬肉殘留藥物而遭禁止輸入，對台灣養豬業打擊至鉅，故對豬嗜血桿菌症的防治，仍以菌苗之使用較具安全，具台灣也相繼有不活化菌苗之開發與應用<sup>(1,2)</sup> 然而目前本症菌苗之檢定法，甚為費時，煩雜具材料費稍高，又在地方本病疫情調查及菌苗使用效力之評估等實用上也迫切需要，故較簡便且準確的診斷法實有待開發之必要，而擬定本計畫。

## 材料與方法

(一)試驗材料：

1.供試菌株：

係由本分所檢定用之標準菌株，I、II、V型共3株，經接種SPF 蛋卵黃內，採取感染卵黃，置-70°C保存備用。

2.供試菌苗：

選取國內製品2例，國外製品2例及國外申請委託試驗之製品2例。

3.供試培養基：

係於Brain heart infusin (Difco) 培地中，再加入新鮮酵母抽出液，鷄或豬血清。

4.供試化學藥品：

Latex 液(日本武田藥品工業株式會社SDL-59)。

Hemolysin (Anti sheep RBC - Difco)。

(二)試驗方法：

1.病原菌之增殖：

將以SPF蛋黃低溫(-70°C)冷凍保存之Actinobacillus(Haemophilus) Pleuropneumoniae 之I、II及V型菌分別培養於巧克力培養基(含5%馬血，新鮮酵母抽出液及鷄血清)，置5%之CO<sub>2</sub> 定溫培養箱內培養，俟24小時培養後，選取菌落移植至液體培養基，再次至大量液體培養基行振盪培養8~12小時，收集本菌備用。

2.家兔高度免疫血清之製備：

將上述不同血清型的菌株之大量振盪培養液經8,000 rpm, 30分鐘高速遠心洗滌三次，濃縮成原量之1/100 后，經10 kc/s 10 分鐘之超音波處理製成免疫抗原，選用家兔(3~4kg)15隻，每型菌株各免苗5隻，其免疫步驟為第一次1ml (菌液加等量 Freund's complete adjuvant )皮下接種，2週后再分別以單獨之抗原由0.1~0.5ml 逐步增加其注射量，每隔3天靜脈注射一次，經一週後，再注射2 ml, 7天後，開始採血測定凝集抗體，直至已達所需力價時放血，分離血清備用。

3.各種不同血清學反應抗原之製備與反應術式：

A 補體結合抗原(CF)：

參照Gunnarsson & Bi berstein<sup>(6)</sup> (1976), Nakai & Kume<sup>(12)</sup>, 及 Lombin<sup>(10)</sup> 等(1982)之法並加修改，即將經遠心洗滌濃縮為原培養菌液之1/50 量之本菌菌體液，再經超音波處理，遠心之上清液；另為化學藥品 phenol 處理，透析而成之CF 抗原，其反應術式，係將受檢血清以含1%仔牛血清之VBS 依2倍稀釋後，加入3單位補體，4單位抗原，於4°C一夜感作，翌日再加入溶血系，再於37°C, 30分鐘感作，然後判讀其阻止溶血情形。

B 試管凝集抗原(TA)：

參照 Nicolet<sup>(14)</sup> (1971) 及 Bachmann<sup>(6)</sup> (1972) 之法，將遠心洗滌3次的菌體，再調至適當濃度之全菌體懸浮液(於波長540nm之OD值為0.6)，置於4°C備用。其反應術式，係於試管中將受檢血清以2倍稀釋法，用0.15M NaCl液稀釋後，將等量之TA 抗原0.5 ml 加入，於25°C定溫水槽中，經一夜之感作，翌日判讀。

C 乳液凝集抗原(LA)：

依 Mitui<sup>(12)</sup> 等(1981)之法，將遠心洗滌3次之菌體經濃縮成原培養液之1/50 量后(約10<sup>10</sup> CFU/ml)，經超音波10 kc/s 20分鐘處理，20,000 rpm, 20分鐘遠心之上清液再與1%的乳液(Latex)甘氨酸緩衝食鹽液等量混合，於4°C攪拌作用一夜，即成LA 抗原。其反應術式用V型反應盤將受測血清0.025 ml, 以PH7.2之PBS依二倍稀釋法稀釋后，再加入等量之0.025 ml LA 抗原，經充分混合，置於37°C, 18小時，翌日判讀。

4.檢定菌苗對八週齡小豬之免疫：

就送檢之菌苗4批對八週齡小豬16頭，其中8頭於菌苗接種二週後再補強注射，並於第四週再以10<sup>9</sup> CFU/ml 之菌液

3 ml 鼻腔內攻擊，同時攻擊時採血，供抗體測定。

#### 5. 田間 6 週齡小豬菌苗之免疫：

選取委託試驗之本菌菌苗 2 家，對田間六週齡小豬施予免疫注射 200 頭，其中 100 頭於第一次免疫後，再補強注射，各群豬隻於試前及菌苗接種後第二、四、八、十二週齡採血，供血清學反應抗體測定。

### 結 果

各種不同血清學反應對家兔高度免疫血清之特異性：

就各不同菌型之家兔高度免疫血清分別以 CF、TA 及 LA 等血清學反應試驗，其中以菌體經超音波處理之 CF 抗體，因含有抗補體，影響反應效果，故取 phenol 抽出法抗原，進行 CF 血清反應。就表一之 CF 反應，僅 II 型菌對異型 Hetero 間有 4~8 倍反應外，I 與 V 型菌於 Hetero 間皆呈陰性反應；就表二之 TA 反應，顯示各菌型於 Hetero 間至少有 8 倍以上（8~64 倍）之反應；表三之 LA 反應，則大致與 CF 相似，除 II 型菌對 Hetero 間有 8~32 倍之反應外，I 與 V 型菌在 Hetro 間仍呈陰性反應，綜合各種不同之血清學反應得知同型 Homo 間的反應較 Hetero 間有顯著的差異，顯示各有其特異性，惟 I 型菌之與 II、V 型菌間之反應稍明顯，然三者之血清學反應法，似乎乳液凝集反應之效果較佳。

表一 A. pleuropneumoniae I、II 及 V 型菌之家兔免疫血清的補體結合反應

家兔高度 免疫血清	補體結合抗原 *		
	I	II	V
I	128	4	< 4
II	4	64	8
V	< 4	< 4	64

\* 係以 phenol 抽出之 CF 抗原。

表二 A. pleuropneumoniae I、II 及 V 型菌之家兔免疫血清的試管凝集反應

家兔高度 免疫血清	試管凝集抗原		
	I	II	V
I	512	32	32
II	32	256	64
V	16	8	512

表三 A. pleuropneumoniae I、II 及 V 型菌之家兔免疫血清的乳液凝集反應

家兔高度 免疫血清	乳液凝集抗原		
	I	II	V
I	1,024	8	< 4
II	32	512	16
V	< 4	8	1,024

各種不同血清學反應對 A. pleuropneumoniae 菌苗免疫豬隻抗體間的關係：

就 4 批其中 A、B（為 II 型菌），C、D（為 V 型菌）送檢之 A. pleuropneumoniae 不活化菌苗免疫八週齡小豬，免疫豬又分一劑及二劑量（即一劑量間隔二週補強）免疫後，經活菌鼻腔內（ $10^9$  CFU/ml - 3ml）攻擊，結果如表四所示，各供試豬之 CF 抗體產生較遲緩，且一次免疫豬全例呈陰性反應，TA 與 LA 產生情形相類似，經 A. pleuropneumoniae 攻擊，補強注射豬皆可耐過存活，且 LA 抗體 16 倍以上者大致可耐過。顯示本菌菌苗之使用，應以二次免疫始可得較佳之防禦效果，而抗體之測定，似以 LA 較具實用。

田間豬隻經 A. pleuropneumoniae 不活化菌苗免疫後之不同血清反應抗體的測定：

據二組供委託試驗之菌苗分別對台南(TN)、台中(TC)轄內豬場六週齡小豬田間試驗，結果如表五所示，CF 抗體之產生高峯期

爲 17.75 ~ 19.69 仍然較 TA 之 28.84 ~ 33.12 或 LA 之 20.39 ~ 28.84 等之幾何平均值爲低，且力價也稍低，而 TA 或 LA 抗體則於菌苗注射後第二週起與對照豬相比，有明顯之上升證實豬隻經菌苗注射後，有免疫抗體之產生，惟一次免疫豬較補強注射豬抗體之產生或持續性爲差，故若欲達本病較佳之免疫效果，應當

以二次免疫較妥，又由本次之試驗，證實 TA 或 LA 可供爲菌苗效力之評估，唯 LA 之法可應付較大量之檢體測試且簡便，TA 雖與 LA 測驗結果較一致，但其抗原血清之量較多，故應付較大量的檢體，則顯得煩雜；CF 特異性高，但費時，也非一般技術人員所易接受，但仍可供其他血清反應之比照依據。

表四 A. pleuropneumoniae 不活化菌苗對八週齡小豬免疫后之血清抗體間之關係  
(實驗室試驗)

菌苗別	免疫量	豬 號	血清學反應抗體 *			A. pleuropneumoniae 攻擊後臨床症狀
			CF	TA	LA	
A	一劑量	1	< 4	< 4	< 4	D <sub>7</sub>
		2	< 4	8	8	+
	二劑量	3	< 4	8	8	-
		4	4	16	16	-
B	一劑量	5	< 4	4	4	+
		6	< 4	4	4	++
	二劑量	7	4	32	32	-
		8	4	32	16	-
C	一劑量	9	< 4	4	< 4	D <sub>8</sub>
		10	< 4	< 4	< 4	D <sub>7</sub>
	二劑量	11	< 4	8	8	+
		12	4	16	16	-
D	一劑量	13	< 4	4	4	D <sub>8</sub>
		14	< 4	4	4	++
	二劑量	15	8	32	32	-
		16	8	16	16	-
對照 △	一劑量	17	< 4	< 4	< 4	D <sub>8</sub>
		18	< 4	< 4	< 4	D <sub>8</sub>
	二劑量	19	< 4	< 4	< 4	D <sub>4</sub>
		20	< 4	< 4	< 4	D <sub>4</sub>

註：\* 係依與菌苗同菌型之抗原測定或菌株攻擊，A、B 爲 II 型菌苗，C、D 爲 V 型菌苗免疫豬。

D<sub>7</sub> 表示死亡及斃死於攻擊後之日。

+ 表示有熱反應 40 ~ 41 °C。

++ 表示有 41 °C 以上之熱反應及咳嗽呼吸異常症狀。

△ 對照 # 17 ~ 18 爲 II 型菌，# 19 ~ 20 爲 V 型菌之攻擊。

表五 A. pleuropneumoniae 不活化菌苗對六週齡豬隻免疫后，依不同血清學反應測定之抗體消長（田間試驗）

豬場	組別	免疫後週數	血清學反應抗體（幾何平均值）			
			CF	TA	LA	
TN	免 疫	0	< 4	< 4	< 4	
		一	2	< 4	4.59	4.43
		4	5.85	8	6.49	
		次	8	5.27	6.96	6.27
		12	4.28	5.27	4.50	
		補	4	13.45	< 17.14	16.00
	組	8	17.75	28.84	20.39	
		強	12	10.55	17.14	16.56
		對	0	< 4	< 4	< 4
	照	2	< 4	4	< 4	
		4	< 4	4.14	4	
		8	4.14	4.43	4.28	
		12	< 4	4	< 4	
		組	0	< 4	4	< 4
	TC	免 疫	0	< 4	4	< 4
一			2	< 4	5.65	5.65
4			6.72	9.18	8.57	
次			8	5.46	7.46	6.72
12			5.27	5.85	5.46	
補			4	16	19.69	16.56
組		8	19.69	33.12	28.84	
		強	12	13.92	21.11	20.39
		對	0	< 4	< 4	< 4
照		2	< 4	< 4	< 4	
		4	< 4	4.14	< 4	
		8	< 4	< 4	< 4	
		12	4.28	4.43	4.28	
		組	0	< 4	< 4	< 4

註：血清反應之抗原，其使用菌型係與菌苗所含有之菌型相同，TN為II型菌苗，TC為V型菌苗之免疫豬。

## 討 論

就試製之CF、TA及LA等抗原，對A. pleuropneumoniae之各不同菌型的家兔高度免疫血清間之血清學反應，於CF法，僅

II型菌抗原對Hetero間有4~8倍反應外，I與V型菌抗原對Hetero間皆呈陰性反應，而Nielsen<sup>(18)</sup>(1988)之報告，曾就I、III、VI、VII及IX型菌間行CF之交叉反應，結果III、VI、VII間與I、IX間皆有互相交叉反應發

生, Gunnarsson<sup>(7)</sup> (1979) 將抗原依不同方法處理製成之 CF 抗原, 其反應也呈交叉現象, 惟經 phenol 抽取者降低很多之交叉反應, 但其未提起該法製成之 CF 抗原是否有抗補體現象發生, 而筆者本次試驗中, 經超音波處理之抗原因有抗補體現象, 因此也採 phenol 抽取者, 且其交叉反應甚低。於 TA 法, 則於 Hetero 間至少有 8 倍以上 (8~64 倍) 之交叉反應, Gunnarsson 等<sup>(9)</sup> (1977) 就 I、II、III、IV 型菌間進行凝集反應, 部份菌型間, 諸如 III、IV 型仍有交叉凝集現象, 惟該等係將抗血清依同型菌體加以吸收處理, 期降低菌型間之交叉反應, 而筆者此次試驗之家兔抗血清係未經處理, 故 Hetero 間顯示較高之反應。LA 法, 與 CF 法呈相似的效應, 即除 II 型菌在 Hetero 間有 8~32 倍之交叉反應外, I 與 V 型菌之 Hetero 間仍呈陰性反應, 據 Mitui 等<sup>(12)</sup> (1981) 就 I、II、III、V 型菌間之反應, 在 Hetero 間為 8~16 倍之交叉反應此與筆者之試驗相似。據前述之 CF、TA 與 LA 抗原對家兔抗血清之反應, 雖部份呈低倍之交叉反應, 此筆者認為可能家兔於免疫時, 各型菌於製成免疫抗原時, 培養過程中, 夾帶培養基之共同成份, 於免疫家兔時產生之非特異性抗體, 因 Gunnarsson 等<sup>(9)</sup> (1977) 曾試以菌體去除免疫血清中之非特異性抗體, 效果不錯。

就送檢之 II、V 型菌不活化菌苗各兩批, 免疫八週齡小豬, 並於第一次免疫後第四週分別各以同一型攻擊且採血, 依 CF、TA 及 LA 法測定血中抗體, 據 Nielsen<sup>(16,18)</sup> 等 (1974, 1977, 1988) 報告, 豬隻經 *A. pleuropneumoniae* 接種後 10~14 天即可測出 CF 抗體, 但筆者此次試驗, 至四週仍有未被測出抗體者。TA 抗體除一劑量免疫之部份豬隻外, 與對照比較, 其抗體有顯著的產生。LA 抗體之產生大致與 TA 相似, 即 Mitui<sup>(12)</sup> 等 (1981) 稱 LA 抗體係屬 IgM。豬隻於菌苗接種後第一週即可測出 8 倍 LA 抗體, 2~4 週最高, 此次試驗補強豬仍有高達 32 倍 LA 抗體者, 豬隻經活菌攻擊, 除部份一次免疫豬外皆可耐過, 且其抗體若  $CF \geq 4$ ,  $TA > 16$ ,  $LA > 16$

者皆無反應, 此顯示血清反應上, CF 抗體之產生較 FA 及 LA 慢, 且二次免疫始可得較佳之免疫抗體。

就 I、V 型菌之菌對田間六週齡豬隻免疫後, 依固定週別採血, 以 CF、TA 及 LA 測定其抗體, 與實驗室相同, CF 抗體之產生較慢, 於四週始測得, 而 TA 與 LA 於第二週即可測得, 但不論 I 或 V 型菌一次免疫之豬, 雖其抗體與對照豬有所差異, 可是若依實驗室試驗結果評估, 如欲抵抗活菌之攻擊, 皆未達其有效抗體價 (即  $CF \geq 4$ 、 $TA$  與  $LA > 16$  倍), 唯有補強免疫豬始顯示其有效抗體價。

據本試驗, 證實 CF、TA 及 LA 等血清學反應抗原, 對 *A. pleuropneumoniae* 之免疫血清具特異性, 且以 LA 為最簡便之診斷方法, 可供本症菌苗檢定及田間菌苗應用效果之評估, 以把握防疫時機, 但尚有其他之 2-ME-TAT 法<sup>(11)</sup>, ELISA<sup>(6,16,19)</sup> 間接血球凝集法<sup>(6)</sup> 尚待來日追試並加以探討, 以利本症診斷, 又菌苗對田間豬隻之試驗, 以 CF、TA 及 LA 血清學反應測得, 本病於防疫上菌苗之使用, 應以二次免疫較理想。

## 參考文獻

1. 徐興鎔、張靖男、羅麗華、胡大光、林柏蒼、劉福蔭、周擬元, 1978: 豬副溶血性嗜血桿菌肺炎之研究—福馬林死菌苗對豬隻免疫效果。台糖公司畜產研究所試驗報告 66 / 67 期, 147-155。
2. 張靖男、羅麗華、朱賢主、沈詠梅 1979: 副溶血性嗜血桿菌肺炎菌苗之改良及其免疫上各種問題之探討。台糖公司畜產研究所研究試驗報告 67 / 68 期, 163-173。
3. 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鑑定。台灣省畜牧獸醫學會 75 年度秋季學術演講會摘要 17。
4. 翁仲男、徐興鎔、羅麗華、沈詠梅、劉福蔭, 1976: 豬副溶血性嗜血桿菌肺炎血清學與免疫學之研究。台糖畜產研究所研究試驗報告 65 / 66 期, 219-224。

5. Bachman, P(1972) : Beitrag Zur Epidemiologie der Kontagiosen pleuropneumoniae beim Schwein. Schweiz Arch Tierheilkd 114:262-382.
6. Goyette, G., Lativiere, S., Mittal, K.R, & Higgins, R, 1986: Development of enzyme linked-immunosorbent assay for the serodetection of pigs exposed to H. pleuropneumoniae. Proc Int pig Vet Sec. Bare;сна, 256.
7. Gunnarsson, A., 1979 : Evaluation of different antigens in the complement fixation test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infections in swine Am, J, Vet. Res, 40: 1564-1567.
8. Gunnarsson, A and Biberstein, E.L, 1978: Serologic studies of Haemophilus pleuropneumoniae : antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 39 : 1286-1292.
9. Gunnarson, A., Biberstein, E. L., & Hurvell, B. 1977 : Serologic studies on porcine strains of Haemophilus pleuropneumoniae : agglutination reactions, Am. J. Vet. Res., 38 : 1111-1114.
10. Lambin, L.H., Rosendal, S & Mitchell. W.R. 1982: Evaluation of the complement-fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus pleuropneumoniae Con. J. Comp. Med. 46: 109-114.
11. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviers, S & Leblene, D. 1984: A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pig Am. J. Vet. Res. 45: 715-719.
12. Mitui, T., Onaga, H., Nagasawa, Y., Nomura, Y. and kuramasa, S., 1981: Studies on haemophilus infection in swine. I. Application of the Latex agglutination test to the diagnosis of H. pleuropneumoniae infection. Vet Micro bid. 6: 339-349.
13. Nakai, T. & Kame, K. 1987: Serological and bacteriological survey of Haemophilus pleuropneumoniae serovar S. Jpn. J. Vet. Sci 49(6) 1141-1144.
14. Nicolet, J. 1971: Sur l'hemophilose du pore. III. Differentiation serologique de Haemophilus parahaemolyticus. Zentralbl Bakteriol. Abt. Orig., 216: 487-495.
15. Nicolet, J. Krawinkler, M & Baumgartner, A. 1981: An enzyme-linked-immunosorbent assay, using EDTA-extracted antigen for the serology of H. pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 42: 2139-2142.
16. Nielsen, R. 1974: Serological and Immunological Studies of pleuropneumoniae of swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. Acta. Vet Scand., 15: 80-89.
17. Nielsen, R & Mandrup M. 1977: pleuropneumoniae in swine caused by Haemophilus parahaemolyticus A study of the epidemiology of infection. Nord. Vet. Med. 29:465-473.
18. Nielsen, R. 1988: Seroepidemiology of Actinobacillus pleuropneumoniae Can. Vet. J. 29: 580-582.
19. Willson, P.J., Schipper, C & Mor-

gan, E.D. 1988: The use of an enzyme-linked immunisorbent assay for diagnosis of Actinobacillus

pleuropneumoniae infection in pig  
Can. Vet. J. 29: 583-585.



**Evaluation on the immune Efficacy Using Different Serological  
Methods after Vaccination of Pigs with Bacterin of  
*Actinobacillus pleuropneumoniae***

SU JEI-FU

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

We describe in this work a specific, simple seologic method for the inspection and evaluation on the efficacy of vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AP) serotype I, II, were used for the preparation of CF, TA antigens, and all aharad good specifiicy, with La antigen was the simplest of all.

In the laboratory-test, the 8-week-old piglets immunized with bacterins of the different AP serotypes were challenged with 3 ml of live AP bacteria at a concentration of  $10^9$  CFU/ml by intranasal instillation. Only the group which had received a booster vaccination at 2-week intervals could survive the challenge, and the level of serum antibody before challenge (4 weeks after the first vaccination), determined by the CF, TA, and LA methods, were 4-8, 8-32, respectively. These revealed that pigs with antibody titer than 1: 8 times have the ability to surve the challenge. In the field-test, The antibody titer in booster group still it was higher than that of the pigs immunized with inactivated bacterin once. The highest antibody titers presnt at 8-week post-vaccination were 17.75-19.69, 28.84-33.12, and 20.39-28.84 (geometric mean), respectively for CF, TA, and LA metods.