

Edwardsiella tarda 對於試驗動物之致病性與 試製菌苗以小白鼠效力測定模式之研究

陳清 呂清泉 楊喜吟 李淑慧 賴俊雄
張天桂 詹益波 邱仕炎 陳秀男¹

台灣省家畜衛生試驗所

Edwardsiella tarda 之肉羹培養菌液，接種於小白鼠，天竺鼠、鴿子及豬隻測定其致病性之結果，得知未加熱處理菌液或生理食鹽水懸液，對於試驗動物均具致病性，其一般症狀為體溫上昇，食慾減退或廢絕甚至斃死。在試驗豬尚可見耳部、下顎及腹部潮紅出血，剖檢見各處淋巴腺腫脹，周邊性出血及內臟諸器官之出血與壞死。組織學上之變化為典型的出血與壞死病變。由各主要內臟器官及部份病豬血液檢體中回收原接種菌。

試製二批不活化菌苗，以小白鼠腹腔注射免疫，作力價測定之結果，免疫注射一次者與二次者，其耐過攻擊之存活率均相同，且菌液濃度達 $3-4 \times 10^9$ CFU/ml 所製成之菌苗，其防禦力價即可達 10 倍以上之良好效果。由本試驗成績得知，以小白鼠效力測定模式，對於 *Edwardsiella tarda* 菌苗之力價評估具應用價值。

關鍵字：愛德華氏菌苗，效力試驗，“小白鼠模式”。

愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 係腸內細菌科愛德華氏菌屬細菌，為 Gram 陰性小桿菌，其大小為 $0.5 \sim 1.0 \times 1.0 \sim 3.0$ μm ，具周邊性鞭毛，有活潑之運動性⁽¹⁰⁾。本菌最初由 Meyer 及 Bullock 於 1973 年由鯰魚分離成功⁽¹¹⁾，常可由冷血動物及其環境中加以分離，對於鰻魚、鯰魚及其他動物均有病原性。可以說自冷血動物至溫血動物（包括人類）均可受感染⁽¹⁰⁾。由於本菌廣泛存在於自然界之動物及水中^(9, 12)。對於水產動物之為害最大，如鰻魚感染到本菌，可引起腹部膨脹，肛門潮紅，皮膚及鰭之出血斑，肝臟及腎臟灰白色壞死灶^(3, 4)。但對於溫血動物如小白鼠

、天竺鼠、鴿子及豬隻等之致病性如何及其感染後所呈現之病變，則報告較為缺乏。筆者等基於業務上之需要，乃將所培養之菌液，對於供試動物之致病性加以研究探討，並將所試製之不活化菌苗之效力，擬以小白鼠試驗之模式，加以研究，以供嗣後水產動物疾病防治用菌苗，效力評估檢定比較之重要依據。

材料與方法

一、試驗材料：

1. 供試菌株與培養基：*Edwardsiella tarda* ATCC 15469 及 *E. tarda* NTU 851214-3 等菌株供試。所用之培養基為 SS

agar, Tryptic soy agar, Tryptic soy broth及其他生化檢查用特殊試劑及培養基等

2. 供試動物：健康小白鼠體重 13-15g，健康天竺鼠，體重 400-500g，鴿子及供試豬隻 20-25 kg 等材料。

二、試驗方法：

1. 動物接種用菌液之製備：將供試菌株先在 SS agar 平板培養基上稀釋培養 18 ~ 24 小時，以瞭解其特徵發育菌落，再鈎取發育良好之菌落移植於 Tryptic soy broth，在 37 °C 以振盪培養 20 ~ 24 小時。

2. 對於供試動物之致病性與接種菌之回收試驗：將培養所得之菌液，經菌數計算部份並以遠心分離處理之所得上清濾過液，分別以腹腔注射（小白鼠，天竺鼠）皮下注射（天竺鼠），肌肉注射（鴿子），肌肉與口服方式（豬隻）等方法接種於供試動物。另以 70 °C 加熱處理與否之供試菌液或上清濾過液，以測定其是否含有耐熱性致病性物質之存在。對於發病或斃死之供試動物，即予採取試驗材料，供接種菌之再分離培養回收試驗。

3. 斃死動物之病理解剖及組織學檢查：對於供試發病斃死之動物，實施病理解剖檢查，並採取病材浸於 10 % 中性福馬林固定後，再以石臘包埋，切成 6 μ 厚之切片，以蘇木紫及伊紅染色後，在光學顯微鏡下檢查。

4. 不活化菌苗之試製：將供試之 *Edwardsiella tarda* 菌株，培養於特殊培養基如 SS Agar 確認其生化特性後，再移植於試管 Tryptic soy broth 肉羹培養基於 37 °C 下培養 18-20 小時，然後再移植於大燒瓶之 Tryptic soy broth 培養 48 小時，經採樣作菌數計算後添加 0.3 % Formalin 為不活化劑及 0.01 % Thimerosal 為防腐劑，並以 1 N NaOH 溶液修正其 PH 值為 7.0。

5. 菌苗力價測定模式之建立：試製之不同濃度不活化菌苗二批（Lot # 1 為 5×10^8 CFU/ml，Lot # 2 為 $3-4 \times 10^8$ CFU/ml），以小白鼠力價測定模式進行試驗，將菌苗 0.5 ml 腹腔免疫注射，每批使用 60 隻，一週後各分為二群，每群 30 隻，每批試驗小白鼠中之一群，各腹腔補強注射 0.5 ml，然後於

第一次腹腔法射後二週，連同未接種之健康小白鼠 30 隻，各分為三組，每組 10 隻，分別以 10^{8-10} CFU/ml 不同濃度之菌液各 0.2 ml 腹腔注射攻擊之，觀察 10，以求取其 LD₅₀ 之防禦指數。

試驗成績

一、對試驗動物之致病性試驗所得成績：

將肉羹培養所得之菌液，依試驗方法分別接種於供試小白鼠，天竺鼠及豬隻，觀察 10 日所得結果得知，供試小白鼠以 $7.3 \sim 7.9 \times 10^8-10^9$ CFU/ml 之 0.2 ml 腹腔注射者，除 10⁸ 組呈現 50 % 斃死外，其餘均於 24 小時內呈現 100 % 之斃死率。天竺鼠腹腔接種 10^8-10^9 CFU/ml 1 ml 者，亦均於 24 小時內斃死，但皮下接種者經 10 日觀察後均耐過健存。豬隻肌肉接種者於接種 1 日後耳部 1/2 處至耳端呈現特殊症狀之出血斑（如圖 1 所示），體溫上昇至 40.6 °C，且 10⁸ 注射組者於 2 日內斃死，注射 10⁸ 及 10¹⁰ 兩組濃度菌液之二頭豬隻，則均呈現重度感染，耳端呈出血斑及倦怠、體溫上昇，腹部皮下出血斑，經 10 天後慢慢恢復，而口服接種者，除 10¹⁰ 組者呈現體溫上昇，倦怠於 10 日後慢慢恢復耐過，其餘口服 10^8-9 CFU/ml 二組之供試豬隻均未出現明顯之臨床症狀。在所有接種呈現臨床症狀或未能觀察到有臨床症狀而斃死動物，其主要臟器均回收原接種之 *Edwardsiella tarda* 病原菌。詳細如表 1 所示。

二、培養菌液或其遠心上清濾過液經加熱處理與否，對於小白鼠致病性試驗成績：

Edwardsiella tarda 以振盪培養所得之菌液，高速遠心分離上清液再經 Millipore filter (0.45 μ m) 通過之濾液及生理食鹽水懸液各分為二組，其中一組經 70 °C 20 分鐘加熱處理，然後再分別各以 0.2 ml 腹腔注射，經觀察 10 日後得知，本菌株培養液之遠心濾液中，未能檢出引起小白鼠斃死毒素或耐熱性物質之存在。而其致死性物質乃是菌體本身，且受熱 70 °C 20' 溫水浴之影響，可破壞其活性（56 °C 30 分鐘溫水浴亦可使其失去活性）。但在未加熱處理之培養菌液組及生理食鹽水

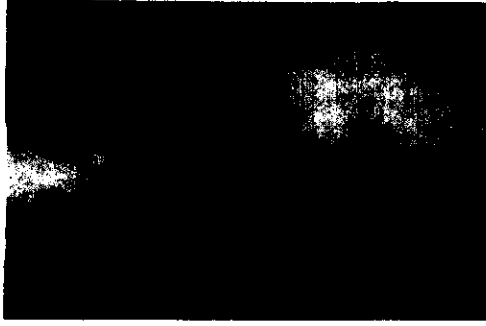


Fig. 1. 1: Hemorrhages of ears skin (pig).

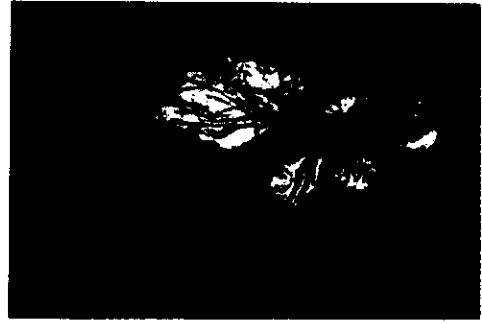


Fig. 2. Subepicardium hemorrhages of heart (pig).

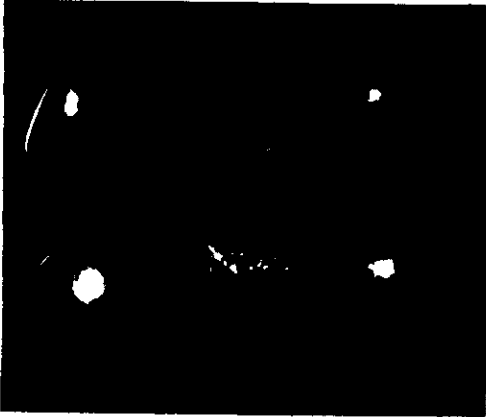


Fig. 3. White spots and hemorrhages necrosis of kidney (pig).



Fig. 4. Urinary bladder: Petechial and ecchymotic hemorrhages of Urinary bladder (pig).



Fig. 5. Hemorrhages of heart (x 200, pig).



Fig. 6. Congestion and hemorrhages of lung (x 100, pig).



Fig. 7. Edema and hemorrhages of lymph nodes (x 100, pig).

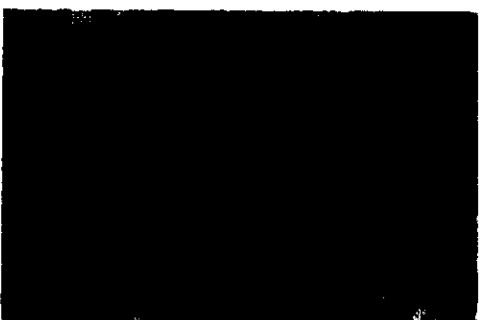


Fig. 8. Bacterial clump in kidney (x 100, pig).

Table 1. Pathogenicity of *E. tarda* to Various Experimental Animals.

Animal	Dose and route inoculated	Results after exposure to various concentration of suspension			
		$7.3-7.9 \times 10^7$ CFU/ml	10^8	10^9	10^{10}
Mouse	0.2ml IP	○ ○	○ ⊕ ₁	⊕ ₁ ⊕ ₁	⊕ ₁ ⊕ ₁
	Bacterial recovery	ND	ND+	++	++
Guinea pig	1ml IP	ND	⊕ ₁ ⊕ ₁	⊕ ₁ ⊕ ₁	⊕ ₁ ⊕ ₁
	Bacterial recovery	ND	++	++	++
	1ml SC	ND	○ ○	○ ○	○ ○
Pig	10 ml IM	ND	⊕	⊕ ₂	⊕
	Bacterial recovery	ND	ND	+	ND
	10ml Oral	ND	○ ○	○ ○	⊕ ⊕

Remarks: ○ : No reaction
 ⊕~⊕ : Indicated the recovered cases after various degree symptoms were appeared.
 ⊕_n : Represent the dead cases, the number indicated dead days after inoculation.
 + : Positive of the bacteria inoculated were recapture.
 ND : Not done.

懸液組，試驗斃死之小白鼠，其肝、脾及心血等材料均回收純粹之原接種菌。詳如表 2 所示成績。

三、培養菌液或其遠心上清濾過液或生理食鹽水懸液經加熱處理與否對於鴿子及豬隻致病性試驗成績：

前述振盪培養菌液，遠心濾過液及生理食鹽水懸液等與供小白鼠接種試驗相同之材料，以鴿子及豬隻作感染試驗之結果，得知加熱 70 °C 處理之三組及未加熱處理遠心上清濾過液組接種動物，均無任何反應。而未加熱處理肉羹培養菌液組，對於接種鴿子及豬隻均有斃死病例，生理食鹽水懸液組鴿子雖無臨床症狀，但供試豬二頭均有臨床症狀，其中一頭血液檢體經培養分離出原接種之病原菌。由此得知其致病性乃存於菌體本身，與小白鼠試驗所得成績頗為相近。詳如表 3 所示。

四、對於接種動物之臨床所見，剖檢病變及組織學上之變化：

供試小白鼠及天竺鼠發生斃死者，均於接種後翌晨即可發現，因此無法觀察到臨床症狀。至於鴿子則可見體溫上昇達 43.6 °C，排乳白色及綠色便，接種部位胸肌蒼白。在接種豬見體溫上昇、倦怠、食慾減退或廢絕，於耳部出血斑等已如前述。

剖檢病變一斃死天竺鼠腹腔除有血性滲出液滯留外，肝臟表面有偽膜。腎臟有出血及壞死斑，在心臟則見點狀出血。斃死豬見各處淋巴腺腫脹及特徵性周邊性出血，心臟及肺臟點狀出血（圖 2），心內膜出血斑，氣管有泡沫滯留並有胸水，腎臟白斑及出血斑（圖 3），膀胱出血斑（圖 4）等。

組織學上之病理變化—典型的出血性敗血症病變，天竺鼠肝細胞腫大及壞死。鴿子的骨

Table 2. Pathogenicity of Mice Inoculated with *E. tarda*

Material	Dose and route inoculated	Mortality of mice inoculated with different treatment of material (%)	
		70 °C 20'	Untreated
Broth culture cell suspension	0.2ml IP	0/10(0)	10/10(100)*
Supernatant of cultured fluid	0.2ml IP	0/10(0)	0/10(0)
Bacterial cells saline suspension	0.2ml IP	0/10(0)	10/10(100)*

Remarks : $7-8 \times 10^9$ CFU/ml of tryptic soy broth shaking cultured suspension were used.

* The organisms caused the death of mice were recaptured from the said mice.

Table 3. Pathogenicity of Pigeons and Pigs Inoculated with *E. tarda*.

Material	Route of inoculation	Results after inoculated with different treatment of material			
		70 °C 20'		Untreated	
		Pigs (10 ml)	Pigeon (0.5 ml)	Pigs (10 ml)	Pigeon (0.5 ml)
Broth cultured cells suspension	IM Bacterial recovery	○ ○	△	⊕ ⊕ ₁ - +	△ ₂ +
Supernatant of cultured fluid	IM	○ ○	△	○ ○	△
Bacterial cells saline suspension	IM Bacterial recovery	○ ○	△	⊕ ⊕ - +*	△

Remarks : ○ △ : No reaction

⊕ : Indicated the recovered pigs after slight reaction.

⊕_n △_n : The dead cases, number indicate dead days after inoculation.

- : No bacteria recovery.

+ : Positive of bacteria inoculated were recovery.

* : Bacterial recovery positive from blood specimen.

骼肌呈嚴重的岑克氏壞死，肌纖維細胞橫紋消失，均質化，顆粒化及溶解，壞死灶並有細菌塊之存在。豬的病變廣泛，心內膜及心肌瀰漫性出血（圖5），肺鬱血及出血（圖6），脾多發性局部壞死，淋巴腺水腫及周邊性出血（圖7），腎臟皮質部大區域出血，壞死及嚴重

的散播性血管內凝血（Disseminated intravascular coagulation; DIC）病變，膀胱粘膜層及粘膜下層出血。上述臟器病灶尚可見大小不一的菌塊（圖8）。以上臨床所見，剖檢病變及組織學上之變化，摘要如表4及附圖所示。

Table 4. Main Clinical Signs and Gross Lesions of Guinea Pigs Pigeons and Pigs after Exposure to *E. tarda*

Clinical signs :	
Guinea pigs :	Died suddenly without clinical signs.
Pigeons :	Greenish diarrhea, appetite drops.
Pigs :	Reduced appetite. Elevated temperature (40.6 °C) Hemorrhages of skin(esp ears and abdomen).
Gross lesions :	
Guinea pigs :	Liver :White spots, Kidney :Petechial hemorrhages white spots.
Pigeons :	Pectoral muscle of injected site : pale.
Pigs :	Tonsil : Suppurative ulceration, Lung : Petechial hemorrhages, Heart : Endocardial and subepicardial hemorrhages, Liver : Slight congestion swelling, Spleen : Slight swelling, Lymph nodes : Swelling peripheral hemorrhages, Kidney : White spots hemorrhage necrosis, Urinary bladder : Petechial or ecchymotic hemorrhages.
	Bacterial recovered
	+
	+
	+
	+
	+
	+
	+
	+
	+
	+

Table 5. Results of Efficacy Test of Trial *E. tarda* Bacterin in Mice.

Group	Dose and route of immunization	Survival after challenge with different concentration of organisms (%)			LD ₅₀
		7.3-7.9 × 10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	
Experimental	Lot 1. 0.5 IP	10/10(100)	6/10(60)	0/10(0)	10 ^{9.17}
	0.5 IP (Twice)	10/10(100)	6/10(60)	0/10(0)	10 ^{9.17}
	Lot 2. 0.5 IP	10/10(100)	10/10(100)	0/10(0)	10 ^{9.5}
	0.5 IP (Twice)	10/10(100)	10/10(100)	0/10(0)	10 ^{9.5}
Control	—	10/10(100)	0/10(0)	0/10(0)	10 ^{8.5}

Remarks : 1. Bacterin booster were done at one week interval.
2. Challenge with 0.2 ml IP each mouse, were performed at 2 week after first immunization.

五、試製菌苗以小白鼠試驗模式作效力測定之試驗成績：

將試製之二批不活化菌苗，以小白鼠腹腔免疫注射經二週後，再以腹腔注射攻擊之結果，得知試製 Lot # 1 菌苗（含 5×10^8 CFU/ml）免疫注射一次者與二次者，其 LD_{50} 之防禦指數均為 $10^{9.17}$ ，而試製 Lot # 2 菌苗（含 $3-4 \times 10^9$ CFU/ml）免疫注射一次者與二次者，其 LD_{50} 之防禦指數則均為 $10^{9.5}$ ，對照為 $10^{8.5}$ 。第二批菌苗之效果顯較第一批為優，其力價與對照組相較達 10 倍，獲得良好之免疫成績。由本試驗成績得知，*E. tarda* 菌苗，以小白鼠腹腔免疫注射一次者，即可達相當程度之保護效果，無須再作補強注射，且小白鼠效力測定模式對於本菌苗力價之評估具應用價值，如表 5 所示成績。

討 論

愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 由於廣佈於自然界及水中^(1,5)，因此對於環境之污染及引起動物疾病之為害，至為重要。尤以水產動物如鰻魚之病害，更是不可忽視，有關本菌引起鰻魚之疾病，已有很多報告^(2,8,10,11,13,14)。本菌雖對溫血動物之為害不如冷血動物（尤以鰻魚）之大。但由本試驗中，得知對於供試動物仍具相當程度之致病斃死率，並由試驗斃死動物之肺、肝、脾、淋巴腺、心臟及腎臟等臟器與部份血液檢體中回收到特徵性純粹之原接種菌。而本菌於培養液中，是否含有如同其他腸內細菌，含有抵抗 70°C 20' 以上耐熱性致病毒素之存在，為究明此一疑問，乃將振盪培養菌液之高速遠心上清濾過液之一部分，加熱 70°C 20 分鐘處理，再行接種試驗，所得成績為否定的。即使是未加熱處理之高速遠心上清濾液（經 0.45μ millipore filter），亦未能測出含有致病性物質之存在。而引起試驗動物之疾病者乃在於菌體本身，而此菌體經 56°C 30 分鐘加熱處理後，即可使之失去活性（經小白鼠接種試驗均能耐過健存）。本菌對於試驗動物之致病性已如試驗成績所述。

由郭等⁽²⁾報告，得知本菌對於 Nalidixic acid, kanamycin 及 Nitrofurantoin 等之

感受性最高，而對 Tetracycline, Chloramphenicol, Polymycin B 及 Colistin sulfate 等四種藥物，則於不同地區，不同時間所分離之菌株，呈現不同之感受性。對 Oleanandomycin, Novobiocin 及 Sulfisoxazole 等顯示無感受性。據王⁽¹²⁾之報告，由 230 株具抗藥性菌株中，檢出 46 株具轉移性 R 因子，因此對於以藥物治療或預防方式則難免因抗藥性因子之轉移而有所顧忌。更由郭等⁽⁴⁾所提供之資料中，得知本菌對抗菌劑之反應，時常發生變化，因此試以菌苗之預防方法，以期防治本菌引起鰻魚病害之舉。

筆者等多年來從事於生物製劑之研究開發及生產工作，因此乃參考筆者等⁽⁶⁾產製同為腸內細菌科病原菌大腸桿菌症菌苗之方式，從事於本菌苗之試製工作。同時參考筆者等⁽⁷⁾對於大腸桿菌症菌苗對小白鼠免疫力之評估試驗方法，擬應用於試製之 *Edwardsiella tarda* 不活化菌苗之效力試驗，雖然 *E. tarda* 菌苗開發之目的，在於預防鰻魚之愛德華氏病，原應以鰻魚為材料作為感染防禦試驗較為妥善。但在本試驗中尚未以鰻魚之防禦力價加以探討，而僅先以小白鼠效力試驗模式加以研究，其目的乃在於希望能訂出如同哺乳動物牛、豬、羊及家禽類預防用菌苗，可使用小白鼠等試驗動物之試驗模式加以檢定，以利實際應用之需要。至於小白鼠之效力測定成績與預防鰻魚愛德華氏病，是否平行，以及再提高菌苗濃度後其免疫效力可否成比例提昇與菌苗之使用法保存性等問題，擬進一步加以探討研究。

誌 謝

本研究之完成，承蒙行政院農業委員會，在魚病疫（菌）苗，噬菌體及病毒檢驗試劑開發計劃經費之補助，國立台灣大學獸醫學系劉朝鑫教授提供寶貴試驗資料，台大漁業生物試驗所黎錦超先生及本所林旭志、許振祺二位同仁之協助與慨贈部分試驗材料，謹併誌萬分之謝忱。

參考文獻

1. 王建雄。1985。養殖環境中 *Edward-*

- siella tarda* 菌的藥物抗藥性，血清型及病原性之研究。國立台灣大學獸醫學研究所碩士論文。
- 郭上卿、鍾虎雲、郭光雄。1977。養殖鰻魚潰瘍病病原菌 *Edwardsiella anguillimortiferum* 之分離，魚病研究專集(-)，1-6。
 - 郭光雄、劉正義、劉朝鑫。1986。魚病專輯一鰻魚，台灣養豬科學研究所。80-85。
 - 郭光雄、陳秀男、劉朝鑫、董明澄。1984。鰻病防治手冊。台灣區鰻魚產銷連繫小組編印。
 - 陳昭德、郭光雄。1978。養殖鰻細菌分佈之研究。魚病研究專輯(二)。15-32。
 - 陳清、呂清泉、詹益波、林再春、周寬典、賴俊雄、吳金島、張天桂、李健郎、林旭志、陳光男。1985。豬大腸桿菌疫苗製造改進與田間應用試驗。台灣省畜牧獸醫學會會報。45:43-54。
 - 陳清、呂清泉、詹益波、賴俊雄、張天桂、林旭志。1986。豬大腸桿菌疫苗對小白鼠免疫效力之評估試驗。台灣省畜牧獸醫學會會報。48:59-66。
 - 劉正義及蔡信雄。1980。台灣養殖鰻之潰瘍病。魚病研究專輯(三)。109-115。
 - 朴守一、若林久嗣、渡邊佳一郎。1983。養鰻池に分布する *Edwardsiella tarda* の血清型と病原性，魚病研究，Fish Pathology。18(2): 85-89。
 - 伊沢久夫、福田芳生、阿部勳雄、中島健次、長林俊彦。1983。水生動物疾病學、朝倉書店。145-146。
 - 江草周三。1984。魚の感染症。訂正版。恒星社厚生閣。164-172。
 - 皆川武夫、中井敏博、室賀清邦。1983。養鰻環境における *Edwardsiella tarda*。魚病研究，Fish pathology 17(4): 243-250。
 - David McDaniel. 1975. Procedures for the Detection and Identification of Certain Fish Pathogens, Revised 1979, American Fisheries Society Fish Health Section. 58-60.
 - Meyer, F.P., and G.L. Bullock. 1973. *Edwardsiella tarda*, A New Pathogen of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*), Applies Bacteriology. 25:155-156.
 - Roberts, Ronald, J. 1978. Fish Pathology. P. 190-191. Bailliere Tindall. London.
 - Sakazaki Riichi. 1967. Studies on the Asakusa Group of Enterobacteriaceae (*Edwardsiella tarda*) Japn. J. Med, Sci, Biol, 20:205-212.

STUDIES ON PATHOGENICITY OF EDWARDSIELLA TARDA TO
EXPERIMENTAL ANIMALS AND POTENCY ASSAY OF
TRIAL BACTERINS IN "MOUSE MODEL"

Ching Chen, C.C.Lu, S.Y.Yang, S.H.Lee
J.S.Lai, T.G.Chang, I.P.Chan, S.Y.Chiu, and S.N.Chen¹.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Pathogenicity tests were carried out on Mice, guinea pigs, pigeons and pigs with *Edwardsiella tarda* broth culture suspension. The results indicated that both the original bacterial cell suspension and normal saline suspension were pathogenic to all experimentally infected animals. The clinical signs noted included fever, anorexia and even to death. Congestion and hemorrhages on ears, chin and abdomen were also observed in infected pigs. The autoptic findings included swelling and peripheral hemorrhages of lymph nodes on various region, hemorrhage and necrosis of some visceral organs. On the other hand, the histopathologic finding revealed typical hemorrhagic and necrotic change. The pathogens were recovered from various visceral organs and parts of blood specimen of pigs inoculated.

Two different concentrations of inactivated trial bacterin were prepared. The potency assay was carried out in mice by intraperitoneal immunization. The potency level of the single dose was the same to that of booster injection after challenge of the two different concentrations of bacterins. The result indicated that the protection potency in 10 times if the bacterin contains $3-4 \times 10^9$ of organisms per milliliter. This experiment strongly suggested that the "Mouse model" could be applied for potency assay on *Edwardsiella tarda* bacterin.