

猪博德氏菌與巴氏桿菌混合菌苗之研製與應用

陳清 呂清泉 詹益波 賴俊雄 張天桂 林旭志
周寬典¹ 李清圳¹ 楊宗德¹ 蔡貴雄¹ 吳森江¹ 陳光男¹

台灣省家畜衛生試驗所

試行研製之猪博德氏菌與巴氏桿菌混合菌苗，以小白鼠及天竺鼠為材料，行安全試驗之結果，均無任何不良之接種反應，並以小白鼠作免疫效力試驗之結果得知，抗博德氏菌之防禦指數大於 100 (LD50 試驗組為 $10^{9.9}$ / 對照組為 $10^{7.0}$)。對於巴氏桿菌之攻擊結果，試驗組之耐過存活率為 87.5%，對照組為 0%。

田間應用試驗共接種 60 頭懷孕母豬，免疫前採血測定抗博德氏菌之抗體得知陰性者佔 25%，有低倍抗體者 (陽性反應) 佔 75%，免疫後其血清中抗體價幾何平均值為 639.05，哺乳仔豬之幾何平均值亦高達 503.32。由所得之成績顯示研製之混合菌苗安全性高，且免疫效果亦甚顯著。

由博德氏菌及巴氏桿菌所引起猪隻及家兔之上呼吸道疾病相當普遍，雖其引起之急性斃死病例不多，但是由於長期污染及感染數據之大，對於環境衛生及飼料利用效率之降低，其影響却很大。世界各國對於本病之研究亦已有相當的成就，諸如病原之分離鑑定，診斷用抗原之開發，菌苗之研製等等 (1,2,3,4,5,6,7)，早期之試驗研究均以主要病原博德氏菌之研究為主。近年來由於具有皮膚壞死毒 (Dermonecrotic toxin) 巴氏桿菌之被發現及其所扮演之角色，受到相當的矚目 (9,10,11,12,13,14,15)，因此二種病原混合研製菌苗日漸受到重視，其目的希望能更有效防遏本病之為害，生產更有效之菌苗以供養畜業使用。

試驗材料與方法

試驗材料：

供菌苗研製之菌株：為筆者 (陳等) (5,6,7) 所分離供菌苗製造之博德氏菌一型菌株及巴氏桿菌 Type D 菌株。

培養基：使用馬鈴薯浸膏培養基及添加 0.5% 酵母浸出液之 Tryptic soy agar 及 Proteose No 3 agar 等。

材料動物：13 - 15 公克之健康小白鼠，350 - 450 公克之健康天竺鼠及懷孕母豬、哺乳仔豬等。

試驗方法：

試用菌苗之研製與應用：將博德氏菌及巴氏桿菌分別培養所得之菌液，經 Formalin 不活化處理後加以調製，並以鋁膠為佐劑，仿照陳等 (8) 製造單價菌苗之方式試製菌苗供試，並依該報告之免疫方式進行混合菌苗之免疫應用試驗。

安全與效力試驗：參照民國 64 年 11 月 21 日經濟部公布動物用藥品檢驗標準第三章第十四節及台灣省政府公報冬字第 19 期第 38 節現行猪萎縮性鼻炎菌苗及巴氏桿菌不活化菌苗之檢定標準，加以測定。

試驗結果

1. 試製混合菌苗對於小白鼠之免疫力價：

依照目前現行檢驗豬萎縮性鼻炎菌苗之方法測定之結果，其抗博德氏菌之防禦指數 > 100 ，達到國家標準其詳細成績如表一。

2. 對於抗巴氏桿菌之小白鼠免疫效果：

將菌苗仿照前述方法免疫二週後，再以 Type D 之巴氏桿菌行腹腔攻擊之結果得知，其耐過存活率達 87.5%，而對照組為 0%，顯示免疫效果頗佳，詳如表二。

3. 試製混合菌苗對於懷孕母猪之免疫及哺乳仔猪所獲移行抗體測定成績：

抗博德氏菌抗體之測定結果，免疫前母猪抗體價 < 10 或呈低倍價者，經免疫後其抗體價均呈顯著之上昇達 $\times 320 \sim \times 1,280$ 而其初乳均高達 $\times 5,120$ 。其 4 日齡哺乳仔猪之抗體價亦高達 $\times 320 \sim \times 1,280$ 。詳如表三所示。

表 一：試製豬萎縮性鼻炎混合菌苗免疫小白鼠對於抗博德氏菌之保護試驗成績

Table 1: Results of the Protection Test against *Bordetella bronchiseptica* of Atrophic Rhinitis Combined Vaccine in Mice

組別 Group	劑量及免疫途徑 Dose and route used for immunization	* 攻擊菌量及耐過存活數 (%) Concentration of bacterial cells used and survival after challenge				LD ₅₀
		10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	
試驗組 Experimental	10 ⁻¹ 0.5 ml IP	8 / 8 (100)	8 / 8 (100)	8 / 8 (100)	3 / 8 (37.5)	10 ^{9.8}
對照組 Control	—	5 / 10 (50)	0 / 10 (0)	0 / 10 (0)	—	10 ^{7.0}

* 攻擊菌株：*Bordetella bronchiseptica* 12-1 strain。
Challenge strain

表 二：試製豬萎縮性鼻炎混合菌苗免疫小白鼠對於巴氏桿菌之保護試驗成績

Table 2: Results of the Protection Test against *Pasteurella multocida* of Atrophic Rhinitis Combined Vaccine in Mice

組別 Group	劑量及免疫途徑 Dose and route used for immunization	* 攻擊菌量及耐過存活數 Concentration of bacterial cells used and survival after challenge		
		10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
試驗組 Experimental	10 ⁻¹ 0.5 ml IP	10 / 10 (100)	7 / 8 (87.5)	7 / 8 (87.5)
對照組 Control	—	7 / 10 (70)	3 / 10 (30)	0 / 10 (0)

* 攻擊菌株：*Pasteurella multocida* type D strain.
Challenge strain

表 三：豬博德氏菌與巴氏桿菌混合菌苗免疫懷孕母豬及其哺乳仔豬之抗體測定成績
 Table 3 : Anti-*Bordetella bronchiseptica* Titers of The Sows Immunized with *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* Combined Vaccine and Their Suckling Piglets.

組 別	母 豬 號 Sow No.	母 豬 抗 體 Titer of sow		價 值 No. of	試 仔 豬 數 piglets tested	哺 乳 仔 豬 抗 體 (4 日 齡) Titers of suckling piglets (4-day old)		備 註 Remarks
		免 前 Before Vaccination	免 後 After Vaccination			範 圍 Range	幾 何 平 均 值 G.M.T.	
試 驗 組 Experimental	4,039	< 10	640	5,120	7	640-2,560	1,280.00	
	4,028	40	640	5,120	5	640-1,280	1,114.30	
	946	< 10	1,280	5,120	8	320-1,280	640.00	*
	698	40	320	5,120	8	320- 640	414.98	*
對 照 組 Control	4,029	< 10	10	20	4	10	10	
	376	80	80	40	8	< 10	< 10	*

* 購自田間試驗豬場母豬
 G.M.T.: Geometric mean titer.
 Bought from field experimental farm.

4. 田間試驗抗博德氏菌抗體之成績：

於雲林縣某農場接種 60 頭懷孕母猪，於免疫前先行採血測定抗體之結果，得知抗體陰性者有 15 頭（佔 25%），有低倍抗體者 45 頭（佔 75%），其幾何平均抗體為 14.50，經免疫後（基礎免疫 2 ml，補強注射 5 ml）其抗體價為 $\times 160 \sim \times 2,560$ 其平均值为 639.05。而 4 日齡哺乳仔猪之抗體價（每胎採血 1 - 2 頭）平均值亦高達 503.32。詳如表四所示成績。

表 四：豬萎縮性鼻炎混合菌苗田間應用試驗母猪及其哺乳仔猪抗體分佈

Table 4 : Distribution of the Anti-*Bordetella bronchiseptica* Titers of Sows Immunized with AR Combined Vaccine and That of Their Suckling Piglets in the Field Application Tests

倍 數	Titer	母 猪 頭 數 No. of sows		仔 猪 抗 體 分 佈 Titers distribution of the piglets
		免 疫 前 Before Vaccination	免 (產) 後 After Vaccination	
	$\geq 2,560$		2	2
	1,280		12	9
	640		19	39
	320		9	24
	160	2	2	10
	80	16		
	40	8		
	20	10		
	10	9		
	< 10	15		
供 試 總 頭 數 Total number tested		60	44	84
幾 何 平 均 值 G . M . T		14.50	639.05	503.32

討 論

博德氏菌與巴氏桿菌對於引起豬（兔）萎縮性鼻炎，雖其致病性因子均以能產生皮膚壞死毒素（Dermonecrotic toxin）為主，但兩者所扮演之份量並非相等，由 Sawata 等⁽¹⁶⁾報告(1984)，在田間調查研究發現猪隻未注射市售單價 *Bordetella bronchiseptica* 不活化菌苗者，具有萎縮性鼻炎症狀者高達 92.3%，而免疫群者僅有 12.5%，顯示目前之市售博德氏菌苗具有相當之保護效果。因此猪隻之萎縮性鼻炎仍以博德氏菌為主。然而近年來由於 Type D 巴氏桿菌之被發現對於猪萎縮性鼻炎亦扮演著相當之角色，因此在預防上所使用之菌苗，也就朝向多價菌苗之目標而努力。在本試驗中，無論是實驗室之試驗或田間應用方面，抗博德氏菌苗免疫所得之成績並無差異。也就是說混合巴氏桿菌後不影響單價抗體之產生。而巴氏桿菌對於小白鼠之免疫效力評估上，免

陳清 呂清泉 詹益波 賴俊雄 張天桂 林旭志 周寬典 李清圳 楊宗德 蔡貴雄 吳森江 陳光男 45
疫組之保護力價達 87.5%，而對照組則為 0%，顯示是有相當之免疫效果。然對巴氏桿菌抗體之測定則尚待探討研究。

誌 謝

本研究計畫承蒙行政院農業委員會 75 農建 - 7.1 - 牧 - 26 (4) 經費之補助，家畜衛生科林科長再春博士，劉枝正永和博士及本所邱所長仕炎博士之指導與鼓勵，得以順利完成，謹併誌萬分之謝忱。

參 考 文 獻

1. 徐興鎔、許淑英、周癡元 (1969) : 豬傳染性萎縮性鼻炎病因與病理發生之研究，台糖公司種畜繁殖場研究年報 57-58 年期 74-85。
2. 徐興鎔、許淑英、曹 彤、周癡元、朱瑞民、洪澤湖、陳太平 (1972) : 豬萎縮性鼻炎病因病理發生與防治之研究，*Bordetella bronchiseptica* 人工感染仔豬試驗，台糖公司種畜場 60-61 年期研究報告，147-156。
3. 王貞富、張聯欣、馬清獻、李武雄 (1974) : 豬萎縮性鼻炎預防之研究，台糖畜產研究所年報 62 / 63 年期，263-283。
4. 馬清獻、張聯欣、劉福蔭、李武雄、王貞富 (1975) : 豬萎縮性鼻炎預防之研究 II 母豬及仔豬 AR 不活化菌苗免疫之效果，台糖公司畜產研究所年報 63 / 64 年期 241-256。
5. 陳清、李全、林地發、陳忠松、邱朝齊、陳守仕、林再春 (1974) : 豬萎縮性鼻炎集團發生例及分離病原菌 *Bordetella bronchiseptica* 之生物學性狀，台灣省畜牧獸醫學會會報 24，51-61。
6. 陳清、謝快樂、呂清泉、林旭志、林再春 (1981) : 豬萎縮性鼻炎診斷用抗原之研製與應用，中華民國獸醫學會雜誌 7，1-6。
7. 陳清、呂清泉、林旭志、張天桂、李進海、楊揚輝、傅祖慧、謝快樂 (1983) : 家兔萎縮性鼻炎抗體之調查與博德氏菌分離之研究，中華民國獸醫學會雜誌 9，67-73。
8. 陳清、呂清泉、詹益波、邱仕炎、賴俊雄、張天桂、林旭志、洪典戊、李肇祥 (1984) : 豬萎縮性鼻炎菌苗之研製與應用，台灣省畜牧獸醫學會會報 43，62-74。
9. Chang, C.F. 1982 ; *Pasteurella multocida* serotypes, Biochemical characteristics and Drug Susceptibility isolated in Taiwan Taiwan Jour. Vet. Med. and Hadb. No 40. 47-52.
10. de Jong, M.F. H. L. Oei and G. J. Tetenburg 1980 : AR-Pathogenicity-tests for *Pasteurella multocida* isolates IPVS. copenhagen, Denmark 211.
11. Harris D. L. and W. P. Switzer 1968 : Turbinate Atrophy in young pigs Exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined Inoculum. Am J. Vet. Res Vol. 29 No. 4 777-785.
12. Hippe W. and Schliesser IH, 1981 : Kulturelle and Serologische untersuchungen an *Pasteurella multocida* stammen Von Kaninchen Mit Erkrankungen der oberen Atemwege Ebl. Vet Med. B. 28 645-653.
13. Hippe W. (1982) : Eur ätiologischen Bedeutung Von *Pasteurella* and *Bordetella* für den Anstechonden Schunpfen des Kaninchens Tierärztliche umschau 37 (4) 284-290.
14. Nakai, T, A, Sawata and K. Kume (1985) : Intracellular locations of dermo-

- necrotic toxin in *Pasteurella multocida* and in *Bordetella bronchiseptica* Am. J. Vet. Res. Vol. 46. No. 4 870-874.
15. Sawata, T., R.B. Rimler and K.R. Rhoades (1982) : Indirect Hemagglutination Test that uses Glutaraldehyde Fixed Sheep Erythrocytes Sensitized with Extract Antigens for Detection of *Pasteurella* Antibody. Journal of Clinical Microbiology Vol. 15. P. 752-756.
16. Sawata. A., T. Nakai, M Tuji and K. kume (1984) : Dermonecrotic activity of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Japanese Field. Jpn. J. Vet. Sci. 46 (2) 141-148.

Studies on Production and Application of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida Combined Vaccine for Swine

Ching CHEN, C.C. LU, I.P. CHAN, J.S. LAI, T. G. CHANG, S.T. LIN, K.T. CHOU¹, C. J. LI¹, T. D. YANG¹, G. S. TSAI¹, S. J. WU¹ and K. N. CHEN¹

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

An attempt to test the safety of a developing combined vaccine including Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida using mice and guinea-pigs, the results indicated that the vaccine tested in this study was safe after inoculation. The results of its immunogenicity test on mice showed that the protection index from Bordetella bronchiseptica was more than 100 (LD₅₀ of experimental group/LD₅₀ of control group was $10^{9.8} / 10^{7.0}$). Similar results were found that the survival ratios were 87.5 and 0 in experimental group and control group, respectively, after challenge by Pasteurella multocida.

A total number of 60 pregnant sows were used for field immunization test. Low antibody titer to Bordetella bronchiseptica of 75% of sows was detectable and other (25%) were detected without antibody titer before vaccination. The geometric mean titer (GMT) of sows of antibody to Bordetella bronchiseptica was 639.05 after vaccination. GMT of suckling piglets was also high up to 503.32. This results suggest that the combined vaccine used in this study is safe and its immunogenicity is evident.

