

# 臺灣豬麥可菌病之研究

## Ⅲ. 屠豬 *M. hyopneumoniae* 抗體調查與麥可菌性肺炎之病理學、血清學反應及螢光抗體法之比較研究

蘇杰夫<sup>1</sup> 鄭建盛<sup>1</sup> 陳素貞<sup>1</sup> 廖述吉<sup>1</sup>

翁仲男<sup>2</sup> 劉正義<sup>3</sup> 林再春<sup>4</sup>

自高雄及桃園兩屠宰場採取屠豬血清總數 1,000 例，行血清學反應以測定 *M. hyopneumoniae* 抗體。呈補體結合反應 (CF) 陽性率為 35.8 % 而間接血球凝集反應 (IHA) 則為 40.7 %。

另由兩屠宰場再採取 250 例屠豬之肺臟及其血清，進行豬麥可菌性肺炎之病理學、血清學反應及螢光抗體法檢出病原體 *M. hyopneumoniae* 之比較研究。供試 250 例肺臟中，顯現典型之麥可菌性肺炎之肉眼及組織病理變化者 110 例 (44.0%)。以螢光抗體 (FA) 直接法對病原體之檢索，陽性反應者 100 例 (40.0%) 其中 97 例具有陽性之組織病變。血清學反應方面，IHA 有 98 例 (39.2%)，CF 有 86 例 (34.4%) 呈陽性反應，而其中 91 例 IHA 陽性豬及全部之 CF 陽性豬亦伴隨有麥可菌性肺炎病灶。IHA 法之陽性率高於 CF 法，且操作簡便，可做為生前診斷及摘除麥可菌性肺炎之應用。

### 緒 言

豬麥可菌性肺炎是一種普遍感染於豬隻且引致經濟損失之重要疾患。Mare & Switzer<sup>10)</sup> (1965)，Goodwin 等<sup>11)</sup> (1965)，Hodges 等<sup>12)</sup> (1969) 相繼證實其主要病因為 *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. Suiopneumoniae*)。感染豬之肺炎肉眼病變與感染 *Adeno virus*，*M. hyorhinis* 及 *Pasteurella multocida* 之病變可能相似，必須行組織病理學檢查及病原分離鑑定才能正確診斷。如若擬摘除野外感染本病之豬隻，則選擇特異性高之診斷方法是迫切需要的。CF<sup>6,9,12,19-21)</sup>，IHA<sup>14-15)</sup> 反應等血清學診斷方法已被證實，可用於測定 *M. hyopneumoniae* 感染病豬之血中抗體。在臺灣，劉等<sup>1)</sup> (1972) 曾就病理學方法以調查且得知屠宰豬罹患肺炎病例中 63.9% 有豬麥可菌性肺炎之病理變化。陳等<sup>5)</sup> (1975) 之調查也有 67.4% 的陽性率。筆者<sup>2-3)</sup> 也曾就臺灣分離株製成 CF 抗原，並依製成之抗原對臺灣各地豬場進行

*M. hyopneumoniae* 之抗體調查，其中有些地區之陽性率達 42.0%，種母畜更有高達 52.5% 以上者。為瞭解臺灣一般屠豬本病之污染情形，並比較本病之病理學、血清學反應及病原體間陽性率關係而進行本試驗，其結論或可為來日擬摘除本病之重要參考憑據。

### 材料與方法

#### 一、屠豬肺臟及血清之採取：

(i) 由高雄及桃園電動屠宰場各抽樣採取 500 頭屠豬之血液，經凝固以冷藏輸送箱保存，帶返臺灣省家畜衛生試驗所分離血清，並置於 -20°C 保存，以供 CF 及 IHA 等血清反應用。

(ii) 由高雄屠宰場蒐集 50 頭及桃園屠宰場蒐集 200 頭之血液、肺臟。其血液之處理如 (i) 所述，肺臟則一部份以 10 % 中性福馬林液固定，另一部份凍結保存，以供組織病理學、螢光冷凍切片之病原體檢索及血中 *M. hyopneumoniae* 抗體測定之比較試驗。

#### 二、血清學診斷用抗原及術式：

供試之 CF 抗原及反應術式已於前篇敘及<sup>2-3)</sup>。IHA 抗原係 *M. hyopneumoniae* 經 37°C，

民國70年8月19日受理

1. 臺灣省家畜衛生試驗所
2. 臺灣養豬科學研究所
3. 國立屏東農專獸醫科
4. 行政院農業發展委員會

3~4天迴轉培養後，以 pH7.0, 0.01M. PBS, 15,000 rpm, 30 分鐘遠心洗滌三次，其濃縮之菌體浮游液再經超音波處理，並與 Glutaraldehyde (Sigma) 固定之綿羊紅血球吸著而製成，其反應術式仍以微量法，即受檢血清先經新鮮綿羊血球處理後，以 1% 健康家兔血清 PBS 稀釋後，再加入 1% 血球含量之 IHA 抗原等量混合（其總反應量為 0.05ml），室溫 2 小時之靜置感作，隨後判讀。血清稀釋倍數 32 倍以上呈凝集反應者為陽性例。

### 三、病理組織學之檢查：

經 10% 福馬林固定的肺臟標本，經石臘切片，再以 Haematoxylin-Eosin 染色，以行組織病理學檢查。

### 四、螢光標示抗體之製備：

將豬抗 *M. hyopneumoniae* 高度免疫血清（其 IHA 抗體價為 4.096, CF 為 320），用 33% 的飽和硫酸銨沉澱處理 3 次，收集球蛋白，經 0.01M, pH 7.2, PBS 透析，去除硫酸銨後，測定蛋白質含量，再與定量之 Fluorescein isothiocyanate 結合，經 Sephadex (G-25, Coarse) 除去未結合的螢光色素，再用 0.005M, pH 7.0 PBS 透析，次經 DEAE Cellulose 除去非特异性螢光物質及 F/P 之比率較大的螢光抗體，最後以 0.45 $\mu$  過濾膜過濾即成精製的螢光標示抗體，分裝於小試管 (1 ml)，置於 -20°C 保存備用<sup>4,17)</sup>。

### 五、螢光抗體組織冷凍切片：

經凍結之肺臟製成冷凍切片，置於玻片上風乾，以 Methyl alcohol 固定 10 分鐘，風乾，然後滴入 2 單位之螢光標示抗體液，置於含濕箱內，經 37°C, 30 分鐘之感作染色，以 PBS 洗滌 3 次，再滴入 chelated azo dye (0.1% Eriochrome black T。N, N, dimethyl formamide 溶液 10 ml, 50 ml N, N, dimethyl formamide, 20 ml 蒸餾水, 10 ml 之 0.1 M. AlCl<sub>3</sub> 溶液及 10 ml 0.1 M. Acetic acid, 然後用 1 N NaOH 調整 pH 至 5.2)，行對抗染色 30 秒，再以 PBS 洗滌一次，風乾後行螢光顯微鏡檢查。

### 結果與討論

由高雄及桃園南北兩屠場各採取屠豬血清樣本 500 例，CF 及 IHA 反應，測定 *M. hyopneumoniae* 抗體。CF 陽性率為高雄場 37.4% (187/500)，桃園場 34.2% (171/500)，合計為 35.8%；IHA 陽性率為高雄場 42.8% (214/500)，桃園場 38.6% (193/500)，合計為 40.7%，(如表一所示)。其結果與筆者<sup>3)</sup>於 1978 年應用 CF 以調查各養豬場之 *M. hyopneumoniae* 抗體之結果 30.4% (311/1,020) 接近，充分顯示麥可菌性肺炎仍然十分猖獗。

表一 臺灣屠豬 *M. hyopneumoniae* 之 CF 及 IHA 抗體調查

屠場別	檢查頭數	CF 抗體價						IHA 抗體價					
		10	20	40	≥80	合計	32	64	128	256	≥512	合計	
高雄	500	51	56	49	31	187	62	81	37	18	16	214	
桃園	500	45	48	43	35	171	56	79	33	14	11	193	
合計	1,000	99	104	92	66	358	118	160	70	32	27	407	

又 250 頭由高雄及桃園屠宰場之肺臟中具有肺炎肉眼病變者，共檢出 52.8% (132/250)。其中顯示支氣管及血管周圍類淋巴組織增生及淋巴球浸潤和肺泡間隔細胞增生等典型之麥可菌性肺炎之組織病理變化者 44.0% (110/250)。此外，螢光冷凍切片之病原體 *M. hyopneumoniae* 檢索陽性率為 40.0% (100/250)，血清學反應方面則顯示 IHA 陽性率為 39.2% (98/250) 及 CF 為 34.4% (86/250)。若就已呈麥可菌性肺炎之典型組織病理學變

化之病例以與螢光抗體法檢索病原體及血清學反應陽性之比較，則 FA 為 88.1% (97/110)，IHA 為 82.7% (91/110)，而 CF 為 78.1% (86/110)。(參照表二)

據上述結果，肉眼呈肺炎病變者。其組織病理變化以呈典型之麥可菌性肺炎為最多，顯示麥可菌性肺炎仍然高居豬之肺炎之首位，且與劉<sup>1)</sup>氏在 1972 年所見相同。組織病理變化與 FA、IHA 及 CF 之陽性反應間差異性低，呈相當一致之陽性率

表二 250 頭屠宰猪中麥可菌性肺炎之陽性例與其血清學反應及螢光反應病原體陽性例間之比較

屠場別	檢查頭數	肉眼肺炎病變	SEP 組織病變	凍結切片 FA		血清學反應	
				本病病原體檢索		IHA $\geq 32$	CF $\geq 10$
高 雄 園	50	29	24	21 $\Delta^1$		21 $\Delta^3$	18
	200	103	86	79 $\Delta^3$		77 $\Delta^5$	68
合 計	250	132	110	100 $\Delta^3$		98 $\Delta^7$	66
	(%) 100	52.8	44.0	40.0		39.2	34.4

註： $\Delta$ ：無麥可菌性肺炎組織病理變化之頭數。

。又各血清反應之陽性率間雖亦無多大的差異，但 CF 反應的陽性率仍稍低 ( $P < 0.05$ )，可能係因 CF 雖有高度特異性，但猪血清中存在着 Natural Hemolysin 及 procomplement 之緣故。Takatori 等<sup>20)</sup> (1968) 及 Boulanger & L'Ecuyer (1970)<sup>7-8)</sup> 用未經非動化之仔牛血清稀釋補體；Hodges & Betts<sup>12)</sup> (1969)，Robert & Little<sup>13)</sup> (1970) 及 Wallis & Thompson<sup>21)</sup> (1969) 將受檢猪血清不經非動化處理；Slavik & Switzer<sup>19)</sup> (1972) 及 Blackburn 等<sup>6)</sup> (1975) 之用 SPF 小猪血清稀釋補體，以期抑制此不利於 CF 反應之因子。筆者也曾試以彼等之各種方法進行本項試驗，結果仍未能完全除去此障礙，但以 Slavik & Switzer<sup>19)</sup> 等法似較前者為佳。由於 Natural Hemolysin 及 Procomplement 之存在，降低其檢出率，將來若能設法除去猪血清中的 Procomplement 且不影響血中抗體力價，提高檢出效率，將可增強該法之使用價值。

Lam & Switzer<sup>15)</sup> (1971) 曾以 IHA 法對實驗感染猪及野外之猪隻行 *M. hyopneumoniae* 抗體的測定，結果在 62 頭俱有肉眼病變之實驗感染猪中，測出 57 頭含有 *M. hyopneumoniae* IHA 抗體；87 頭俱有肉眼肺炎病變的野外猪中，檢出 68 頭陽性反應。Holmgren<sup>14)</sup> (1974) 曾就認為有本病污染之猪場肉猪於屠宰時，以肉眼病理檢查及 IHA 測定其抗體，結果於 98 頭俱有肉眼病變之猪中檢出 87 頭呈 IHA 陽性反應；且於被認為無麥可菌性肺炎感染之猪羣 61 頭中僅測出 2 頭呈 IHA 陽性反應。筆者本次應用 IHA 試驗結果，顯示呈麥可菌性肺炎典型之肺炎病變 110 例中，IHA 陽性反應高達 91 頭。可見應用 IHA 為本病之生前診斷有其實用價值且優於 CF 法。惟 IHA

陽性反應猪隻仍然有 7 頭並無肺炎病變，這可能是由於組織切片之採樣部位不是肺炎病變部或不顯性感染或已經治癒而仍然可測得抗體的緣故。又 IHA 試驗上，由於猪血清對綿羊血球會產生溶血現象，故 Lam & Switzer<sup>15)</sup> (1971) 以猪血球代替綿羊血球及 Holmgren<sup>14)</sup> (1974) 用 Formaldehyde 固定猪紅血球以製成 IHA 抗原。這些雖可免除猪血清 IHA 反應上對綿羊血球產生溶血之顧慮，但其穩定性不佳。筆者此次仿 Cho 等<sup>9)</sup> (1974) 之方法製成猪 *M. hyopneumoniae* 之 IHA 抗原，於本次試驗顯示良好結果。且加入 50% 之甘油，保存於 4°C 經半年以上，仍有相當穩定而不失其效力之優點。此外，又因其操作簡便迅速，筆者認為可大力推廣應用以掃除麥可菌性肺炎感染猪場之陽性猪。

FA 法對本病病原體 *M. hyopneumoniae* 之檢索成績與組織病理變化相當一致，但其必須具有冷凍切片設備且檢索方法較具難度，不易以推廣應用。惟其準確性高，當可為鑑定本病之憑據。

## 誌 謝

本試驗承蒙行政院農業發展委員會之經費補助，桃園縣及高雄市家畜疾病防治所之協助採樣，使本試驗順利完成，謹申謝忱。

## 參 考 文 獻

- 劉正義，張照夫，鄭清木。1972。  
屠宰猪隻肺炎之研究。  
臺灣畜牧獸醫學會會報，20:18~31。
- 蘇杰夫，林地發，林榮福，邱朝齊，林再春，劉正義，林茂勇。1977。  
臺灣猪麥可菌病之研究：I、麥可菌種之分離同定及補體結合抗原之研製。  
中華民國獸醫學會雜誌，3:1~8。

3. 蘇杰夫, 鄭建盛, 陳守仕, 林再春, 劉正義。1978。  
臺灣猪麥可菌病(菌質病)之研究: II、麥可菌性肺炎抗體調查。  
中華民國獸醫學會雜誌, 4:67~72。
4. 蘇杰夫, 林再春, 謝竹茂。1971。  
猪假性狂犬病之研究: I、猪假性狂犬病螢光標示抗體之研究及應用。  
臺灣省家畜衛生試驗所研究報告, 8:35~43。
5. 陳清, 陳忠松, 林地發, 張永富, 林榮培, 李全, 李永林, 傅和美, 李金乾, 邱朝齊, 陳守仕, 林再春。1975。  
臺灣猪流行性肺炎之研究。  
臺灣畜牧獸醫學會會報, 26:16~30。
6. Blackburn, B. O., XH. S. Wright and E. M. Ellis. 1975.  
Detection of *M. hyopneumoniae* antibodies in porcine serum by complement-fixation test.  
Am. J. Vet. Res. 36:1381-1382.
7. Boulanger, P. and C. L'Ecuyer. 1968.  
Enzootic pneumonia of pigs: Complement-fixation test for the detection of *Mycoplasma* antibodies in the serum of immunized rabbits and infected swine.  
Can. J. Comp. Med. 82:549-554.
8. Boulanger, P and C. L'Ecuyer. 1970.  
Complement-fixation test for the diagnosis of porcine enzootic pneumonia  
Vet. Rec. 86:448-456.
9. Cho, H. J., H. L. Ruhnke and E. V. Langford. 1974.  
The indirect hemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with mycoplasma.  
Can. J. Comp. Med. 38:13-17.
10. Fujikura, T., S. Namioka and S. Shibata. 1970.  
Tube agglutination test of *M. hyopneumoniae* infection in swine.  
Nat. Inst. Ann. Hlth. Qtr. 10:41-43.
11. Goodwin, R. F. W., A. P. Pomeroy and P. Whittlestone. 1965.  
Production of enzootic pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*.  
Vet. Rec. 77:1247-1249.
12. Hodges, R. T. and A. O. Betts. 1969.  
Complement fixation tests in the diagnosis of enzootic pneumonia of pigs: X. I. Experimental studies.  
Vet. Rec. 85:454-455.
13. Hodges, R. T., A. O. Betts and A. R. Jennings. 1969.  
Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of *M. hyopneumoniae*.  
Vet. Rec. 84:268-273.
14. Holmgren, N. 1974.  
An indirect hemagglutination test for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* using formalinized tanned swine erythrocytes.  
Res. Vet. Sci. 16:341-346.
15. Lam, K M. and W. P. Switzer. 1971.  
Mycoplasmal pneumonia of swine: Development of an indirect hemagglutination test.  
Am. J. Vet. Res. 32:1731-1736.
16. Mare, C. J. and W. P. Switzer. 1965.  
New species: *M. hyopneumoniae* a causative agent of virus pig pneumonia.  
Vet. Med. 60:841-846.
17. Meyling, A. 1971.  
*M. suis pneumoniae* and *M. hyorhinis* demonstrated in pneumonia pig lungs by the fluorescent antibody technique.  
Acta. Vet.Scand. 12:134-141.
18. Roberts, D. H. and T. W. A. Little. 1970.  
Serological studies in pigs with *M. hyopneumoniae*.  
J. Comp. Path. 80:211-220.
19. Slavik, M. F. and W. P. Switzer. 1972.  
Development of a microtitration complement-fixation test for diagnosis of mycoplasmal swine pneumonia.  
Iowa State J. Res. 47:117-128.
20. Takatori, I., R. G. Huhn and W. P. Swizer. 1968.  
Demonstration of complement-fixation antibody against *M. hyopneumoniae* in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia.  
Nat. Inst. Ann. Hlth Qtr. 8:195-203.
21. Wallis, A. S. and G. W. Thompson. 1969.  
The evaluation of a complement-fixation test for the diagnosis of porcine enzootic pneumonia.  
Vet. Res. 85:573-578.

**STUDIES ON SWINE MYCOPLASMOSIS IN TAIWAN:****III. A Survey on Antibody Against *M. Hyopneumoniae* in Slaughtered Pigs and the Comparative Studies on Pathology, Serology and Fluorescent Antibody Technic of Swine Mycoplasmal Pneumonia**

**Jei-Fu Su\*, Jian-Cherng Cheng\*, Suh-Jen Chen\*, Shuh-Jyi Liaw\*,  
Chun-Nan Weng\*\*, Cheng-I Liu‡ and Tzay-Chuen Lin##**

Of 1,000 market pig serum samples collected from Kaohsiung and Taoyuan slaughter houses, the antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by complement-fixation (CF) and indirect hemagglutination (IHA) tests were shown 35.8% and 40.7%, respectively.

In addition, 250 market pigs from both slaughter houses were also randomly collected and studies the lungs and sera by the methods of pathology, serology and direct fluorescent antibody technic (DFAT) in order to compare their accuracy for the detection of mycoplasmal pneumonia. 110 out of 250 cases (44%) revealed the lesions confirmed microscopically. 100 of examined samples were detected antigens in lungs by DFAT, of which, 97 were seen with lesions of mycoplasmal pneumonia. The antibody-positive rates were shown 39.2% (98/250) of IHA and 34.4% (86/250) of CF tests. Among them, 91 with IHA antibody and all with CF antibody cases were also associated with lesions of mycoplasmal pneumonia in lungs.

In this experiment, IHA test is found as the best method used for the detection of swine mycoplasmal pneumonia in hog farm, therefore, it is recommended for the methodology for eradication of this entity.

---

\* From Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

\*\* From Department of Pathology, Pig Research Institute, Taiwan.

‡ From Department of Veterinary Medicine, National Pingtung Institute of Agriculture.

## From Council for Agricultural Planning and Development.