

猪萎縮性鼻炎診斷用抗原之研製與應用

陳清¹ 謝快樂¹ 呂清泉¹ 林旭志¹ 林再春²

使用本所分離成功之 *Bordetella bronchiseptica* 工相菌菌株培養於 Potato infusion agar 在 37°C 下 24 小時，以磷酸緩衝生理食鹽水洗下之菌液調整其濃度為 5×10^{11} / ml，再以 0.2% 福馬林 (Formalin) 不活化，並添加 0.02% 硫柳汞 (Thimerosal) 為防腐劑，以此法製猪萎縮性鼻炎診斷用抗原二種，以平板法及試管法凝集反應檢驗本診所免疫的家兔及田間猪隻之血清。結果得知該等診斷液之準確性很高，且敏感性亦甚穩是。

由二個不同養猪場所採取之 37 例猪隻血清檢驗結果， $\times 20$ 以上陽性者有 20 例 (54%) 且陽性血清最高抗體價有高達 160 倍者，由此可見本省猪萎縮性鼻炎之污染已頗為普遍。

猪萎縮性鼻炎 (Atrophic Rhinitis, AR) 為猪隻重要慢性呼吸器疾病之一，雖其死亡率不高，但使患猪生長緩慢，飼料利用效率降低，增加生產成本及誘發其他慢性呼吸器疾病等，對於企業化養猪損失很大，國外學者積極加以研究^(20,31)，我國亦不例外^(1,2,5,7,8)。至於猪萎縮性鼻炎等呼吸器疾病之控制，雖有以無特定病原猪 (Specific Pathogen Free, SPF Pigs) 做集體置換，使用菌苗以預防其感染，應用診斷用抗體以摘除病猪，使用抗菌物質防治等種種方式^(3,4,6,10,11,12,13,15,17,18,28)，但在我國目前尚未以無特定病原猪為畜產目的推廣之前，需要診斷用抗原之開發研究，以供為診斷及摘除感染猪 (尤以種猪) 及菌苗免疫效力抗體之測定。

材 料 與 方 法

一、試驗材料：

- 1 供用種菌株：1974 年陳等⁽⁹⁾ 在本省某猪場由患猪分離成功保存之 *Bordetella bronchiseptica* 工相菌菌株。
- 2 供試血清：對照用陰性血清，係本所自家生產之初代 SPF 猪血清。陽性血清係以本菌免疫家兔所得之陽性血清。被檢家兔血清係以自行試製菌苗免疫家兔所得之血清。田間猪隻血清係由不同二農場所採取而得。
- 3 對照診斷液：係使用日本北里研究所出品之「AR 抗原」第 22 批次診斷液。
- 4 供製造用培養基：Bordetgengou agar, Potato infusion agar 及 Tryptic soy broth 等。

二、試驗方法：

- 1 診斷用抗原之製造：供用菌株在 Bordet gengou agar 作選擇培養 24~48 小時後，將具有工相菌特徵之菌落移植於 Tryptic soy borth，在 37°C 作預備培養 24 小時，然後再移植於 Potato infusion agar 於 37°C 下行製造培養 24 小時。經檢查其發育情形後再以緩衝生理食鹽水 (PBS)⁽²⁶⁾ 及滅菌玻璃珠將菌苔洗下，並以 PBS 洗滌，在 8,000RPM 下遠心 30 分鐘洗滌三次，濾過及菌數計算。然後再調整其濃度為 5×10^{11} 個菌 / ml，以 0.2% 福馬林 (Formalin) 不活化及添加 0.02% 硫柳汞 (Thimerosal) 為防腐劑。
- 2 凝集反應試驗法：應用平板急速凝集法及試管凝集反應法加以研究^(14,21,22,32,34)。

民國 69 年 11 月受理。

1. 臺灣省家畜衛生試驗所。

2. 行政院農業發展委員會。

本研究報告抽印自中華民國獸醫學會雜誌第七卷第一期。

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 16:29—34 (1980)

結 果

一、試製診斷用抗原凝集力價試驗：

應用前述方法試製診斷用抗原二批 (Lot#1 及 Lot#2)，試製不活化菌苗，免疫家兔供做抗體測定之用，並以對照抗原作為比較試驗。結果在相同處理情況下所呈現之凝集價，防試製二批診斷液之 8 號家兔於第 4、6、及 8 週採取之血清抗體價各有一管之差別外，其餘和對照診斷液之成績均完全一致。

二、應用於診斷田間豬隻血清材料之試驗：

由二個不同豬場所採取之豬血清，以急速平板法及試管法凝集反應試驗之結果，由甲農場 10 個血清樣品中有 6 例，而抗體高者達 160 倍。乙農場 27 個血清樣品之檢驗成績，顯示 $\times 20$ 以上有 14 例，其中抗體價亦有高達 160 倍者。可知本省豬隻受萎縮性鼻炎之污染頗為普遍。而試製二批診斷液和對照診斷液作比較試驗之結果，其成績甚為一致，得知本省試製者已達實用階段之國際水準，詳如表 I 及表 II。

討 論

豬萎縮性鼻炎除對於養豬業之為害外，其病原菌 *Bordetella bronchiseptica* 對於犬、貓、兔、猿鼠、類，天竺鼠、狐、浣熊、火雞、鷄、馬和人亦能引起慢性不顯性的呼吸道感染。因此在公共衛生上扮演一重要之角色^(15,19,25,30)。

本病之抗原和另二種同屬菌，博德氏百日咳桿菌 (*Bordetella pertussis*) 及副百日咳桿菌 (*Bordetella panapertussis*) 之抗血清均能產生類緣之凝集反應⁽⁹⁾。由此可證明彼此間之相關性與重要性。

目前世界各國對於本病，防治，已由以往的模索階段漸漸進入具有價值的實行階段。諸如 SPF 豬之集團置換方式，免疫用菌苗之開發研究及診斷用抗原之應用以摘除病豬等已如前述。而診斷用抗原之製造與應用，雖非為根除豬萎縮性鼻炎之法本方式，惟目前其需要性以日俱增。且由田由病材檢驗成績得知本病在本省之污染頗為普遍，值得吾人加以留意。據 Sung⁽²⁹⁾ 之調查高雄屠宰場，臺灣南部各地區屠宰豬的血清 AR 凝集價之結果，各縣市平均陽性率達 31.2%，其中臺南縣市為 35.7%。高雄縣市為 33%，屏東 22.3%，臺糖豬 18.5%。各鄉值豬隻以臺南縣佳里 51.4% 為最高。抗價 1：體 2. 佔 72.7%，1：160 者有 22。另據 Liu⁽²⁷⁾ 報告，曾由 231 肺炎病例分離出 *B. bronchiseptica* 4 例。陳等⁽⁹⁾ 報告由病猪例及斃死例之剖檢表現有 AR 病變者均伴隨有猪流行性肺炎 (Swine enzootic Pneumonia, SEP) 或稱猪隻可菌肺炎 (Mgwplasmal pneumonie of swine) 之病理變化。由此可知如果因本病而鼻甲介骨有所缺損，形成一大通道，那麼塵埃及微生物等就很容易由外界直接進入肺脈通行無阻，致增加呼吸器疾病感染之機會。

在本試驗中如表 II 之成績得知，被檢血清平板法凝集反應陽性者其試管法測定之力價均在 20 倍以上，反之於平板法試驗陰性者化取一病材作試管法測定之結果，其力價則低於 20 倍 (僅有 5 倍)。由此可知本所試製之診斷用抗原，不論是平板凝集反應或試管凝集反應均已達實用階段之水準。今後擬大量生產供應本省養豬界，以診斷並摘除該病病豬，及供做菌苗免疫猪隻抗體測定評估之用，俾利養豬業之持續發展，並節省進口該項診斷液之外匯。

誌 謝

本研究之完成，蒙前所長陳守仕博士及現任兼代所長農林廳畜牧科邱仕炎科長之鼓勵與指導，於此申誌萬分謝忱。又本所細菌研究股蘇杰夫股長及研究股同仁協助生產 SPF 小豬供用併誌深謝。

參 考 文 獻

1. 林再春(1963)：猪之病毒性肺炎 Virus Pneumonia of Pigs(V. P. P)與萎縮性鼻炎 Atrophic Rhinitis (AR) 對猪之發育影響及其防治對策，臺灣省畜牧獸醫工作報告，5卷3期，8~11。
2. 劉燃炎、呂榮修、詹益波(1967)：猪 AR 發生調查報告，臺灣省畜牧衛生試驗所研究報告 No. 4, 23—52.
3. 林再春、程永昌、楊火松、賴俊雄(1968)：無特定病原猪 (Specific Pathogen Free)。猪生產之研究 I，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 5, 59—70.
4. 林再春、楊火松、程永昌、林進發(1968)：無特定病原 (Specific Pathogen Free) 猪生產之研究 II，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 5, 71—80.
5. 徐興鎔、許淑英、周凝元(1969)：猪傳染性萎縮性鼻炎病因與病理發生之研究，臺糖公司種畜場研究年報57/58年期，74~85。
6. 陳清、林再春、陳守仕、楊火松、林榮培、林地發(1970)：第二代無特定病原猪 (Secondary SPF Pigs) 之繁殖及育成，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 7, 77—83.
7. 徐興鎔、許淑英、曹彤、周凝元、朱瑞民(1972)：猪萎縮性鼻炎病因病理發生及防治之研究，臺糖畜研所研究年報60/61年期，147~156。
8. 劉瑞生(1973)：猪萎縮性鼻炎自然與實驗病例早期感染與病理研究，臺灣省畜牧獸醫學會會報，22期，50~61。
9. 陳清、李全、林地發、陳忠松、邱朝齊、陳守仕、林再春(1974)：猪萎縮性鼻炎集團發生例及分離病原菌 *Bordetella bronchiseptica* 之生物學性狀，臺灣省畜牧獸醫學會會報，24期，51~61。
10. 王貞富、張聯欣、馬清獻、李武雄(1974)：猪萎縮性鼻炎預防之研究，臺糖畜研所研究年報62/63年期，263~283。
11. 馬清獻、張聯欣、劉福蔭、李武雄、王貞富(1975)：猪萎縮性鼻炎預防之研究 II，母猪及仔猪 AR 不活化菌苗免疫之效果，臺糖畜研所，研究年報63/64年期，241~256。
12. 馬清獻、劉福蔭、李武雄、張聯欣(1976)：猪萎縮性鼻炎預防之研究，猪 AR 不活化菌苗預防試驗，臺糖畜研所研究年報，66\45年期，141~153。
13. 馬清獻、張聯欣、劉良心、沈宜中(1977)：猪傳染性萎縮性鼻炎預防之研究 IV，育種場猪群免疫預防 AR 之效果，臺糖畜研所研究年報65/66年期，191~199。
14. 陳清(1977)：猪萎縮性鼻炎，獸醫試驗室檢查法手冊，臺灣省畜牧衛生試驗所編印，447~450。
15. 張聯欣、馬清獻、陳富宏(1978)：猪萎縮性鼻炎預防之研究(續)：V 各種 AR 菌苗對猪隻之預防效果，臺糖畜產研究所66/67年期研究報告，193~20。
16. 馬清獻、張聯欣(1980)：傳染性萎縮性鼻炎，猪病學，中華民國獸醫學會編印，356~367。
17. 林再春、陳守仕、陳清(1980)：以無特定病原猪防治猪病之方法，猪病學，中華民國獸醫學會編印，650~665。
18. 中瀬安清(1973)：AR. ワクチン(豚 ボルテテ 感染症預防液)について。Monthly, The Kitasato Medical News, No. 2320, 1—23.
19. 中瀬安清(1974)：私函資料。
20. 波岡茂郎(1977)：SPF 豚による集團變換，豚病學，近代出版，965~980。
21. 清水健(1970)：豚の傳染性萎縮性鼻炎の病原診斷に關する最近の知見，獸醫界，1~6。
22. 清水健(1971)：豚萎縮性鼻炎 (AR) の診斷上對策(1)(2)，畜産の研究，24、25卷，702~706，836~840。

23. 清水健 (1972) : 豚萎縮性鼻炎における凝集反應の診斷的意義, 畜産の研究, 26卷, 8號, 1009~1014。
24. 清水健、前田稔 (1977) : 萎縮性鼻炎、豚病學, 近代出版, 422~437。
25. 尾形學 (1979) : 豚傳染性萎縮性鼻炎、獸醫傳染病學, 近代出版, 368~371。
26. 醫科學研究所學友會編 (1976) : 細菌學實習提要: 改訂5版, 416。
27. Liu Cheng-I, Chao-Fu, Chang, and Ching-Mu Cheng (1972) : A Study on the Poreine Pneumonias in the slaughter houses, Taiwan, Jour, Vet, Anim, Husb, No. 20, 18-36.
28. Goodnow, Robert. A., C. D. Lehr, F. J. Shad, and J. L. Wisecarver (1977) : Mouse Potency Assay for Bordetella bronchiseptica bacterins, Journal. of clinical Microbiology 337-339.
29. Sung. Hwa-Tsung (1975) : A Serological survey of Bordetella bronchiseptica infection in swine in southern Taiwan using the tube agglutination test. Taiwan. Jour. Vet. Med. & Anim, Hu sb No. 26, 31-35.
30. Switzer, W. P., Mare. C. J., and Hubbard. E. D. (1966) : Incidence of Bordetella bronchiseptica in wildlife and Man in Iowa, Am, J. . Vet. Res. 27, 1134.
31. Twiehaus M. J. and Norman R. underdahl, (1975) : Control and Elimination of Swine Diseases Through Repopulation with Specific Pathogen-Free (S PF) stock. Diseases of swine. Fourth edition. 1163-1179.

Table 1. The Serum Agglutination titer on Atrophic Rhinitis in Field Pigs. (Area 1)

Sample No.	Test	Antigen	1	2	3	4	5	6	8	7	9	10	Control		
													Positive serum	SPF pig serum.	Saline serum.
Tube method	Lot 1		10	20	10	40	20	20	160	40	10	10	1,280	<5	-
	Lot 2		10	20	10	40	20	20	160	40	10	10	1,280	<5	-
	Kitasato No. 11		10	20	10	40	20	20	320	40	10	10	1,280	<5	-
Plate method	Lot 1		-	+	-	+	+	+	+++	+	-	-	+++	-	-
	Lot 2		-	+	-	+	+	+	+++	+	-	-	+++	-	-
	Kitasato No. 22		-	+	-	+	+	+	+++	+	-	-	+++	-	-

Remarks : Serum titers are the reciprocal of the highest serum dilution showing positive response.

+~+++ : Various degree of positive reaction.

- - : Negative reaction.

Table 2. The Serum Agglutination titer on Atrophic Rhinitis in Field Pigs. (Area 2)

Test	Sample Antigen																				Control									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	Positive Saline	SPF pig Serum.
Tube Method	Lot# 1	20	△	20	△	160	△	40	40	40	△	*5	△	△	△	△	△	△	40	40	△	△	40	40	40	40	80	160	1,280	<5
	Lot# 2	20	△	40	△	160	△	40	40	40	△	5	△	△	△	△	△	△	40	40	△	△	40	40	40	40	80	160	1,280	<5
	Kitasato No. 22	20	△	40	△	160	△	40	40	—	△	5	△	△	△	△	△	△	40	40	△	△	40	40	40	40	80	160	1,280	<5
Plate Method	Lot# 1	+	-	+	-	+++	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+++	+++	-	
	Lot# 2	+	-	+	-	+++	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+++	+++	-	
	Kitasato No. 22	+	-	+	-	+++	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+++	+++	-	

Remarks: Serum titers are the reciprocal of the highest serum dilution showing positive response.

+~+++ : Various degree of positive reaction.

- : Negative reaction.

△ : Not determined.

* : Randomly selected for comparison.

Studies on Production and Application of Swine Atrophic Rhinitis Antigen

Chan Ching., Happy. K. Shieh., C. C. Lu., and S. T. Lin.,

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

T. C. Lin.

(Council for Agricultural Planning and Development, Executive Yuan).

Summary

A *Bordetella bronchiseptica* strain isolated in Taiwan was grown on Bordet-gengou agar. Then the colonies of characteristics were selected and transferred into Tryptic soy broth for preliminary culture. For preparation of large quantity of atrophic rhinitis (AR) diagnostic antigen, the isolate was grown on potato infusion agar at 37°C for 24 hours. The grown colonies were washed with phosphate buffered saline, then filtrated and washed again, then adjusted to 5×10^{11} CFU/ml (approximately 6–7% transmittance/620nm at 10^{-1} dilution). The suspension was inactivated with 0.2% formalin and added 0.02% thimerosal was added as a preservative in the final concentration. Two lots of the AR diagnostic antigens were prepared and then checked with plate and tube agglutination methods with rabbit immune sera and swine sera collected from the field. The results showed that both of antigens had very high accuracy and quite stable sensitivity.

In the field application test, swine sera collected from two different farms were examined for AR infection. The positive reaction of AR in farm A and B were 6 out of 10 as well as 14 out of 27 specimens, respectively.

The highest serum titer, 1:160, was ever examined from these locations. It means that the AR infection is considerably high in Taiwan.