

# 猪流行性肺炎病變組織接種SPF小猪之 病變重現試驗

張永富 李正雄 林地發 李全

林再春\*

(臺灣省家畜衛生試驗所)

## 摘 要

由北區名聯電化屠宰場肉眼檢查為猪流行性肺炎者，採取其肺臟病材，以 Hank's balanced salt solution 作成10倍均勻乳劑，經 2,500rpm, 20分鐘遠心後，取其上清液，經 0.45 $\mu$  濾過器濾過，其濾過液，以氣管內接種入 SPF 小猪，引起顯着之猪流行性肺炎病變，並由病變區再同樣做成濾過液，接種於液體培養液，盲目繼代三代，其培養液再接種於固體培養基及再接種 SPF 小猪。在固體培養基，初步分離出 *Mycoplasma* spp.。再接種 SPF 小猪亦產生猪流行性肺炎之病變。其病理組織檢查主為小支氣管壁增厚，類淋巴之增生，單核細胞浸潤及一些滲出液等。

## 緒 言

猪流行性肺炎 (swine enzootic pneumoniae, SEP) 為由 *Mycoplasma hyopneumoniae* 引起之慢性疾病，已經由 Mare and Switzer<sup>(7)</sup>, Goodwin<sup>(9)</sup>, Yamamoto等<sup>(14)</sup> 報告實驗感染成功。筆者為瞭解由本病之肺臟病材乳劑濾過液，接種 SPF 小猪能否產生典型之本病病變，和由接種小猪之肺臟能否較容易分離出本病病原 *Mycoplasma hyopneumoniae* 及其臨床症狀和自然感染例有否不同，故乃由北區名聯屠宰場採取肉眼觀察有本病病變者之肺臟病材，做成乳劑濾過液接種於 SPF 小猪，茲將其所得結果報告如下：

## 材料和方法

1. 由北區民聯電化屠宰場，以肉眼觀察有猪流行性肺炎者，以滅菌剪刀，儘量避免雜菌污染的方法採取肺臟病材，以10隻為1組，將採回之肺臟病材，以 Hank's balance salt solution, 做成10倍之均勻乳劑，然後以 2,500rpm, 遠心20分鐘，取其上清液，經 0.45 $\mu$  濾過器濾過後，供為接種液。並由本接種液接種 SPF 小猪，25天後剖檢肺臟病材，以同樣方法處理之肺臟乳劑濾過液，盲目繼代於液體培養基三代後，供為再接種液。
2. SPF 小猪：仍由本所 SPF 中心供應，將3週齡 SPF 小猪二頭，以氣管接種上述接種液，每次 3c.c. 連續三天。接種後，猪隻每天觀察其臨床症狀並量其體溫，接種20天後，放血剖檢其病變。剖檢時，將有病變者採取，一部分供本病病原之分離，一部分固定於10%中性福馬林，並經石臘包埋，Haematoxylin-Eosin染色，以檢查其組織病理變化。利用再接種液接種之 SPF 小猪之處理方式亦相同。
3. 培養基：所用之培養基係以 Goodwin et al 之配方，即液體培養基以 Hank's balance salt solution 40%, Hartley's broth 30%, SPF pig serum 20%, yeast extract 1.25%, Lactalbumin hydrolysate 0.5 %, thalious acetate 0.1% 及 200IU/ml penicillin。固體培養基，則除上述成分外，再加 0.6~0.8%的 Oxoid Ion agar, 即先將 oxoid Ion agar 稱取需要量，

再加 Hank's balance salt solution, 高壓濕熱滅菌 (121°C, 15 分鐘), 再放入 50°C 恆溫後, 再加上上述其他成分, 而成為固體培養基。培養時, 於 37°C, 含有 5~10% CO<sub>2</sub> 之培養罐培養, 五天繼代一次, 盲目繼代三代。再接再種於固體培養基, 固體培養基除培養於上述培養罐外, 亦可培養在加有 10gm 之 pyrogallol 及等量之重碳酸鈉於其內 (放於 petri dish) 之厭氧培養瓶內。

## 結 果

### 一、接種及再接再種小豬之臨床症狀觀察:

由所接種及再接再種 SPF 小豬之臨床症狀觀察, 其食慾, 精神等方面都很正常。唯接種豬中一頭於第 16 天有發生咳嗽之現象。至於體溫則無顯着變化, 於 39.3—39.8°C 間。

### 二、接種及再接再種小豬剖檢之肉眼及組織病理之變化。

剖檢時, 二頭接種小豬於肺臟之尖葉, 心葉, 橫膈膜葉之前端及中間葉有顯着之病變, 即呈魚肉色之肝樣硬變 (consolidation), 且病變部和非病變部有很明顯之界限。至於再接再種小豬, 亦有相同肉眼病變, 但病變部較小, 且不思及中間葉。

組織病理檢查, 將剖檢試驗豬之肺臟病材於 10% 中性福馬林固定, 石臘包埋, 以 Haematoxylin-Eosin 染色。所有接種及再接再種之小豬, 其組織病理病變相似, 即主要為小支氣管管壁增厚, 並有單核細胞 (mononuclear cell) 浸潤, 以淋巴細胞為主。在小支氣管腔內有滲出液及脫落上皮細胞, 單核細胞等。其周邊亦有類淋巴增生 (lymphoid hyperplasia) 肺泡壁亦增厚, 並含有肺泡巨噬球 (alveolar macrophage)。

### 3. 病原之分離。

將剖檢接種豬之肺臟乳劑濾過液 0.2ml 接種於 5ml 之液體培養基內, 盲目繼代三代後, 再接再種於固體培養基 15 天後, 取出觀察, 出現有二種菌落, 一者菌落較大, 無中央乳頭突起 (central elevation), 一者菌落較小, 有中央乳頭突起。前者可能為本病病原 *M. hyopneumoniae*, 正待進一步同定中。

## 討 論

由肉眼觀察為本病之肺臟病材之濾過液, 接種小豬能引起典型的豬流行性肺炎病灶。其病灶在尖葉, 心葉, 橫膈膜葉之前端, 且病變部和非病變部有很明顯之界限。Mare and Switzer<sup>(6)</sup> (1965), Goodwin<sup>(12)</sup> (1965), R. T. Hodges<sup>(8)</sup> (1969) 及 Sue kurlong<sup>(11)</sup> (1975) 亦都由人工感染, 而引起本病之病灶, 故證明本肺臟乳劑含有本病病原 *Mycoplasma hyopneumoniae* 存在。

接種小豬之肺臟病材濾過液接種於液體培養基, 盲目繼代之後, 其液體再接再種於 SPF 小豬, 亦能產生病變, 唯所產生之病變不像接種豬之病變部那麼大, 且中間葉亦沒有病變, 這說明了本菌於液體培養基能發育, 但病變部較小之緣故, 是否由於菌數較少或其毒力減弱, 有待進一步探討。

將液體培養基繼代於固體培養基中, 無論在 5~10% CO<sub>2</sub> 之培養罐培養或如 Yamomoto<sup>(13)</sup> 之方法, 培養於加有 Pyrogallol 10gm 及等量之重碳酸鈉之厭氧培養瓶內, 都會有菌落產生。*Mycoplasma hyopneumoniae* 為沒有中央突起之菌落, 而 *M. hyorhinis* 則有中央乳頭突起 (central elevation or central nipple), 故在固體型態, 兩者完全不同, 和陳清<sup>(1)</sup> 等分離報告者相同。

在本試驗小豬之臨床症狀看來, 如果本病無繼發二次細菌, 如 *Pasteurella*, *Hemophilus* 或者其他感染, 則本病之臨床症狀不顯着, 但因其對飼料換肉率及生長率減低, 故據 Betts<sup>(13)</sup> (1965), young<sup>(13)</sup> (1965) 等報告, 引起經濟很大之損失。因此在本病防治方面, 在血清學上, 如 Takatori<sup>(4-5)</sup> (1968), D. H Robert<sup>(3)</sup> (1869) 等以 CF test, 及 K. M. kam<sup>(6)</sup> (1971) 以間接血球凝集試驗來測豬對本病之抗體情況, 以及免疫方面之研究, 如 Goodwin<sup>(10)</sup> (1968), Robert<sup>(3)</sup> (1970),

N. Holmgren<sup>(13)</sup> (1970) 等探討，但到目前為止，對於本病防治還沒有一很有效方法，故有待今後之努力。

### 參考文獻

1. 陳清等 (1974) : 在臺灣豬流行性肺炎之研究。
2. D. H. Roberts (1968) : Serological Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs, *Vet. Rec.* 23 : 362—363.
3. D. H. Roberts (1970) : An autoimmune response associated with porcine Enzootic pneumoniae *Vet. Rec.* march 14th, 328.
4. Ichiro Takatori Ronald G. HUHNS and William P. Switzer (1968) : Demonstration of complement-fixation antibody against *Mycoplasma hyopneumoniae* in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 8, 195—203.
5. Ichiro Takatori (1969) : Demonstration of complement-fixation antibody against *Mycoplasma hyopneumoniae* in Japan. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 9. 183—184.
6. K. M. Lam. and W. P. Switzer (1971) : Mycoplasmal pneumonia of swine : development of an indirect hemagglutination test. *Am. J. Vet. Res.* Vol 32 . No. 11. 1731—1743
7. Mare, C. J & Switzer. W. P. (1966) : *Vet. Med.* 60 : 841
8. N. HOLMGREN (1974) : Swine enzootic pneumonia : Immunologic studies in infected sow-herds *Res. Vet. Sci* 17, 145—153.
9. R. T. Hodges, A. O. Betts (1969) : Production of Pneumonia in Gnotobiotic pigs with pure cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* *Vet. Rec.* march 15th (268—272)
10. R. F. W Goodwin, Ruth G. Hodgson, P. Whittlestone (1969) : immunity in experimentally induced enzootic pneumonia of pigs. *J. Hyg., canb.* 67, 193.
11. R. F. W. Goodwin, Pomeroy, A. P. & Whittlestone (1965) : *Vet. Rec* 77 : 1247.
12. Sue L. Furlong, and A. J. Turner (1975) : Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and its association with pneumonia of pigs in Australia. *Australian Vet. Journal* Vol. 51. 145—153.
13. Switzer W. P. (1972) : *Mycoplasmosis and Mycoplasmal pneumoniae disease of swine*, third edition 672—692.
14. YAMAMOTO. Koshimizu and OGATA (1971) . Selective isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pneumonic lesions in pigs. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 11. 168—169.

## The Experimental Infection of Swine Enzootic Pneumonia in Taiwan

Y. F. Chang., C. H. Lee., D. F. Lin., C. Lee.,

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

T. C. Lin

(Joint Commission on Rural Reconstruction)

### Summary

The collection of lung specimen from the united slaughtered house was made if gross examined as S. E. P. leison. The lung specimen then put into the mortar and used Hank's balanced salt solution to make a homogenate 10× emulsion and centrifugated ( 2,500 rpm, 20 minutes), the supernatant fluid filtered with 0.45μ filter membrane. The filtered fluid was intratracheally injected with SPF piglets. After 25 days, the inoculated piglets were autopsied, the apical, cardiac, intermediales and anterior of diaphragm lobes of both lungs showed markedly S. E. P leison. We also used the autopsied lung specimen to make the filtered fluid as the method above again and cultured in liquid media under special condition, after 3 blind subcultured in liquid media, We transferred it to solid media and injected intratracheally into SPF piglet again. On the solid media, there were 2 kind of colony, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis* appeared, The inoculated piglets also showed S. E. P leison.