

布氏桿菌19號菌苗之研製及對牛之 免疫反應

吳義興、賴俊雄、張天桂、楊喜金

(臺灣省家畜衛生試驗所)

摘 要

以美國農業部分讓之牛布氏桿菌19號菌培養於馬鈴薯浸漬培養基內，經72小時後收集菌液，作雜菌檢查、活菌數計算及調整濃度後添加等量之媒劑，分裝並以冷凍乾燥製成牛布氏桿菌19菌苗。成品再經雜菌檢查及真空檢查合格後以國際標準牛布氏桿菌病陽性血清及陰性血清作血清學上之純粹鑑定試驗，結果良好而符合規定。

成品所含活菌之保存試驗，其活菌數於冷凍乾燥後約為乾燥前之 $\frac{1}{6}$ ~ $\frac{1}{10}$ ，乾燥後之成品分三組各保存於冷凍 (-5°C ~ -20°C)，冷室 (4°C ~ 10°C) 及室溫 (20°C ~ 30°C)，結果除室溫組保存性不良外，冷凍及冷室組經保存一年其活菌數約為原來之 $\frac{1}{6}$ ，而且以冷凍組之保存性最佳。

成品經皮下接種於豚鼠及懷孕母兔作安全試驗，結果經觀察2週，除兔子略有熱反應外無任何不良之反應。免疫後母兔血清中之凝集抗體價於第7天急劇上升到 $\times 320$ ，然後緩緩下降到第5個月完全消失，而補體結合反應價到第15天才上升到 $\times 160$ 而後慢慢下降，在免疫後第5個月仍在 $\times 20$ 左右之抗體價。

把成品野外應用接種於4~8個月小牛，大部均會有局部之腫脹及暫時性體溫升高與食慾減退等現象，但均於免疫後第7天全部消失而恢復正常，牛血清中之凝集抗體價於第7天急劇上升到第14天達最高峰二牧場平均抗體價各為 $\times 611$ 及 $\times 278$ ，而後開始下降，至第6個月全部消失。

緒 言

牛布氏桿菌病常在牛羣中造成繁殖之重大障礙⁽¹⁾，嚴重影響畜牧事業之發展及公共衛生，故世界上各畜牧事業發達之國家對本病之防治均極重視，本省畜牧界之養牛業正在起步階段，目前因牛隻數不多，對本病一向作每年定期之血清檢查，以淘汰自然感染陽性牛隻，但在牛隻數目日漸增加的現在必需及時仿照畜牧先進國家之作法，在小牛(4~8個月)時予以菌苗免疫而成牛作定期檢查以淘汰自然感染陽性牛⁽²⁾，才能有效的控制本病。

牛布氏桿菌19號菌苗經在歐美各國使用以來，均證實為迄今免疫牛布氏桿菌病最安全可靠之疫苗，故本省亦自1970開始依美國農業部所提供之資料及分讓之牛布氏桿菌19號菌種株試作該菌苗的製造試驗，並對試製成之該菌苗的保存性與其對實驗動物及本省牛羣之安全性與免疫效果作徹底之研討。

材料與方法

1. 試驗材料

菌株：美國農業部所分讓之牛布氏桿菌19號菌株。

培養基：製造用馬鈴薯浸漬培養基（配方由美國農業部所提供），製法以 250公分之馬鈴薯去皮後切成細塊，加入 1000ml 之蒸餾水後置於 60°C 之溫水槽浸漬 16 小時，取出加上以下配藥：蛋白胨10公克，寒天30公克，無油牛肉汁 5 克，氯化鈉 5gm，甘油 20gm。經混合加熱溶解後，各分裝於廣底培養瓶或其他培養瓶，再加熱 15 磅 20 分滅菌後放涼以供培養用。

菌數計算用培養基：使用 DIFCO 出品之 Tryptic Soy Agar 依其所附處方溶製之。

冷凍乾燥媒劑：以蒸餾水添加 Polyvinyl pyrrolidone (PVP) 0.5%、Lactose 10%、Yeast 5%，溶解後經15磅20分鐘滅菌，放置冷卻後使用，使用前再添加10%之健馬血清。

實驗動物：天豚鼠：體重 300~350gm 之健康天豚鼠。

兔子：布氏桿菌病血清反應陰性之懷孕母兔小牝牛：4~8 月齡之小牝牛。

試管用牛布氏桿菌凝集抗原：日本家畜衛生試驗場出品之抗原。

2. 試驗方法

牛布氏桿菌19號菌苗之製造：

以美國農業部所分讓之牛布氏桿菌19號菌，經蒸餾水之稀釋培養於馬鈴薯浸漬培養基作72小時之增菌培養後，再取出接種於有相同培養基之廣底培養瓶，經24小時之培養作第一次之菌落檢查，檢查無雜菌後再繼續培養，經培養72小時後再次檢查其菌落，把無可疑菌落之培養瓶 5~10個為一組，分別以0.1%之 Peptone 水洗下菌體，各組各收集菌液於一小瓶，各組保存於冰箱並各抽出一小部份以普通培養基作雜菌檢查，經 48~72小時之觀察如為純粹再把各組混合在一起，混合液取出 1ml 以 0.1% peptone 水依10倍法稀釋，再把各稀釋階段液各取出數 ml 培養於 Tryptic Soy agar 經72小時後計算其各稀釋階段每 1ml 之平均活菌數（於每一平皿各加 1ml 培養），依此所測得之菌數而調整菌液之濃度，使其活菌數為添加等量之冷凍乾燥媒劑後每 ml 有 $1 \times 10^{12} \sim 2 \times 10^{12}$ 個，然後分裝於乾燥瓶每一支 1ml，依凍結乾燥程序先放入低溫冰櫃凍結後放入冷凍乾燥機中乾燥，然後經抽真空及封蓋而成品。

牛布氏桿菌19號菌苗之保存性試驗：

冷凍乾燥前計算過活菌數之牛布氏桿菌 19 號菌苗於冷凍乾燥後立刻抽取樣品，每瓶以 1ml 之 PBS 溶解後再依10倍法稀釋而培養於 Tryptic Soy Agar，經 72~96 小時之培養後計算其活菌數以與乾燥前之活菌數作比較，用以測定冷凍乾燥過程對活菌數之影響，並作保存試驗之基礎菌數。把試製成之菌苗分成三組分別以冷凍（-5°C~-20°C），冷室（4°C~10°C）及室溫（20°C~30°C）三種方式保存，其後每隔 2 個月由各組各抽取五瓶，每瓶分別加以 1ml 之 PBS 溶解，然後各組之 5 瓶混合再由混合液抽取 1 ml 依10倍法稀釋，取出培養於 Tryptic Soy Agar 經 72~96小時之培養後計算其平均活菌數。

牛布氏桿菌19號菌苗對實驗動物之安全性及免疫性：

試製成之19號菌苗以 PBS 溶解後皮下接種於天豚鼠，每隻 0.25ml，然後觀察 3 週。溶解後之菌苗（每瓶 1ml）並接種於懷孕母兔，每隻皮下接種 1 ml（其活菌數每 ml 500億以上），免疫接種之兔子除免疫後每天測定體溫二次持續 3 週，並自接種後每隔一段時間由耳部採血，經分離血清及非動化後，以凝集反應法及補體結合反應法測定血清中抗體之產生及消退之情形。

牛布氏桿菌19號菌苗之野外應用試驗：

選 4~8 個月之小牝牛一批，先經每隻抽血檢查其布氏桿菌病之抗體，而後把抗體力價在 5 倍以下者每隻皮下接種試製成之牛布氏桿菌19號菌苗每隻 1 瓶，每瓶均以 5 ml 之 PBS 溶解後使用，接種後每日測量其體溫二次以明其體溫之變化，並觀察其臨床上之反應及局部之變化。免疫接種之小牝牛每隔一段時間即抽血經分離血清及非動化後，以日本家畜衛生試驗場出品之布氏桿菌凝集反應抗原作試管凝集反應，以測定血清中免疫抗之產生及消失情形。

結 果

1. 牛布氏桿菌19號菌苗之製造：依美國農業部所提供之資料，把所分讓得之19號菌種株經增殖培養後分別接種於含馬鈴薯浸漬培養基之培養瓶中，經過72~96小時之培養後，洗下菌體，調整濃度並添加媒劑，經冷凍乾燥而製成。依此前後共製成6批，成品均經真空檢查合格後，抽取數瓶每瓶以滅菌之PBS 1ml溶解，再取出以普通培養基(固體及液體)及特殊培養基如 Blood Agar、Thioglycollate medium 等培養72小時作雜菌檢查亦無可疑之雜菌，成品再抽取數瓶每瓶各以5 ml之PBS溶解後抽出與向日本購得之牛布氏桿菌病國際標準陽性血清及陰性血清作急速法及試管法之凝集反應鑑定試驗，結果以30單位以下之標準陽性血清即可生凝集反應而陰性血清則無凝集現象發生。
2. 保存性試驗：試製成之牛布氏桿菌19菌苗在冷凍乾燥前後均取樣稀釋，各計算其活菌數，此次試驗這批乾燥前之活菌數為 1.56×10^{12} 個/ml，經過冷凍乾燥後其活菌數降到約為原來之 $\frac{1}{6}$ ，平均 2.65×10^{11} 個/ml，與試製成之其他數批相較其下降率較小(試製成之其他數批乾燥後之活菌數約為乾燥前之 $\frac{1}{8} \sim \frac{1}{10}$)。試製成之菌苗一批依不同之方式：冷凍($-5^{\circ} \sim -20^{\circ}\text{C}$)、冷室($4^{\circ} \sim 10^{\circ}\text{C}$)及室溫($20^{\circ} \sim 30^{\circ}\text{C}$)而分三組保存，然後每隔2個月即抽樣計算各組之平均活菌數，此種抽樣計算活菌數繼續一年而止，各組保存後之活菌數減少情形如表1。結果保存方式以冷凍或冷室之方式均甚佳，經過一年之保存二組之平均活菌數各為 5.7×10^{10} 個/ml及 4.5×10^{10} 個/ml，約為剛冷凍乾燥後之 $\frac{1}{3} \sim \frac{1}{2}$ 倍，室溫保存則極劣，經過4個月之保存其平均活菌數降到 1×10^9 ，約為剛乾燥後之 $\frac{1}{260}$ ，足可作為保存方式之對照及作為以後成品輸送應注意避免於室溫太久之提示。

表 1：牛布氏桿菌19號菌苗冷凍乾燥前後及保存後之活菌數

Table 1. Preservative test of Br. abortus 19 strain vaccine

乾燥前	乾燥後	保存方式	2個月	4個月	6個月	8個月	10個月	12個月
1.56×10^{12}	2.65×10^{11}	冷 凍 -- 5°C - 20°C	2.45×10^{11}	1.95×10^{11}	1.25×10^{11}	9×10^{10}	7.5×10^{10}	5.7×10^{10}
		冷 室 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 $^{\circ}\text{C}$	1.97×10^{11}	1.37×10^{11}	1.12×10^{11}	7.7×10^{10}	5.8×10^{10}	4.5×10^{10}
		室 溫 20 $^{\circ}\text{C}$ 30 $^{\circ}\text{C}$	1.60×10^{11}	1.0×10^9	2.1×10^7	9×10^5	5.5×10^5	3×10^3

3. 製成之19號菌苗對試驗動物之安全性及免疫性：試製成之冷凍乾燥菌苗每瓶添加 PBS 1ml 溶解後，皮下接種於天豚鼠10隻每隻 0.25ml。懷孕母兔 5 隻每隻皮下接種 1ml，然後觀察3週，豚鼠10隻均無任何反應或異狀，接種之兔子每隻均有局部之腫脹，但經過3~4天即消失，接種之兔子均有中度之熱反應，其體溫在免疫後3~4天上升，但未影響兔子之正常分娩，免疫後第8天分娩小兔，體溫變化如圖中之一例，其免疫後第8天以後之體溫可能受分娩之影響，但亦於免疫後第13天下降至正常情況。免疫接種之兔子在免疫後第3天、7天、15天、30天及其後每隔10天均採血一次，以試管凝集反應及補體結合反應法測其血清中對牛布氏桿菌病之平均抗體價，其結果如圖2。其平均凝集抗體價在免疫後第3天即上升到 $\times 70$ ，到第7天達最高峰平均為 $\times 320$ ，然後隨著時間逐漸下降，到免疫後第5個月完全消失。但補體結合反應之抗體價於免疫後第3天上升到平均 $\times 40$ ，第7天平均 $\times 90$ ，而於免疫後第15~30天達最高峰，且從第15天起其平均抗體價 $\times 160$ 超過平均凝集抗體價 $\times 140$ ，其補體結合反應抗體價在免疫後第30天才開始緩緩下降，至免疫後5個月其補

體結合反應抗體價仍保有×10之力價。

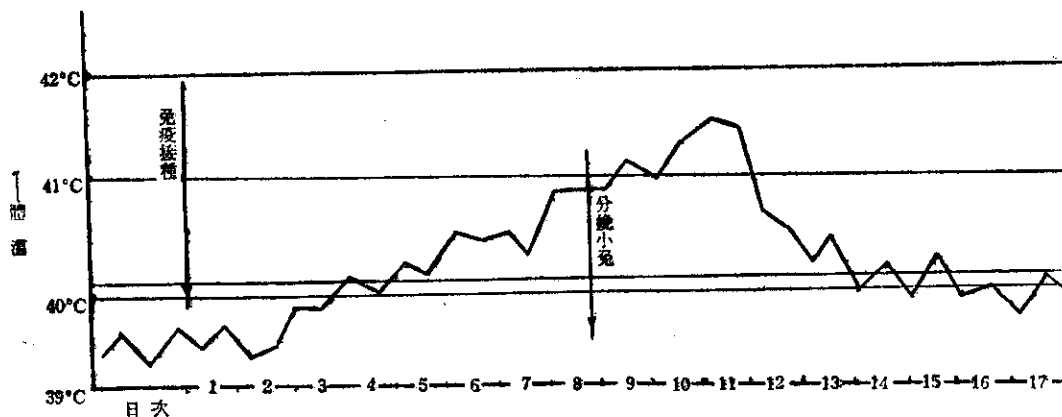


圖 1：懷孕母兔接種菌苗後體溫變化之一例

Fig 1: One case of temperature change curve of immunized pregnant rabbit

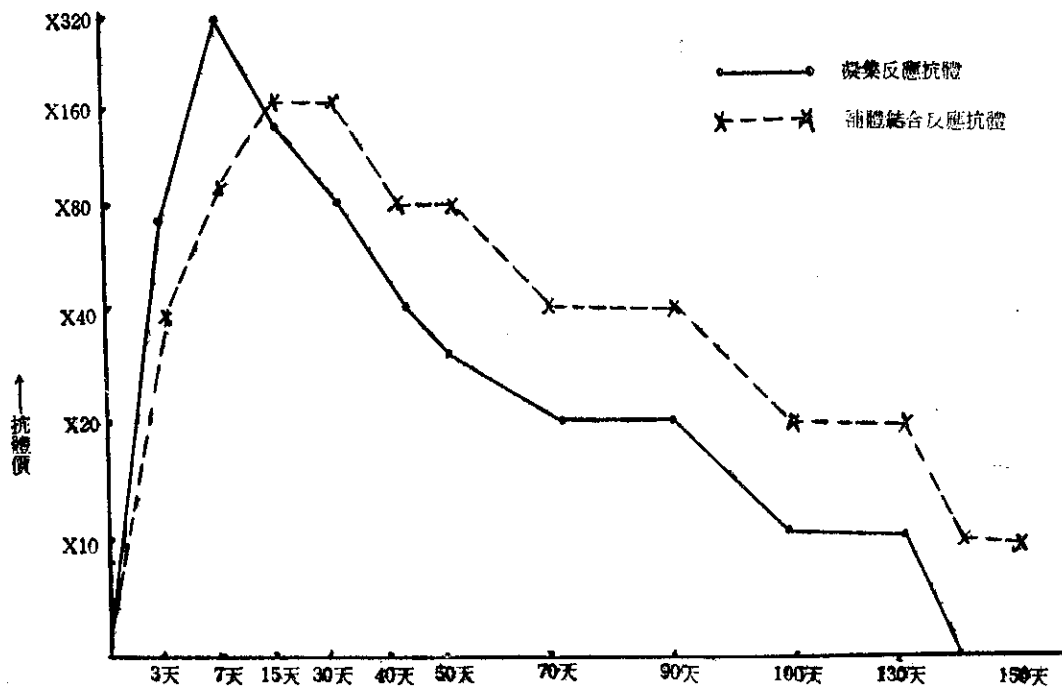


圖 2：懷孕母兔菌苗免疫後抗體之消長

Fig 2: The Curve of antibody titer of immunized pregnant rabbits

4. 菌苗之野外應用試驗：試製成之布氏桿菌19菌苗免疫接種於4~8個月齡之小牝牛共50隻，分別於二牧場，味全牧場30隻及義美牧場20隻，每隻小牝牛均皮下注射製成之菌苗1瓶，每瓶各以5ml之PBS溶解，經接種後14天內每天觀察其局部及全身之反應，並每天測定其體溫之變化。結果在免疫後第一天起即有熱反應之產生，大部於免疫後第2~3天上升至最高峰，於第3~4天體溫才開始漸漸下降，至免疫後第7天大部均恢復正常之體溫，其變化情形如圖3之一例可大概看出。

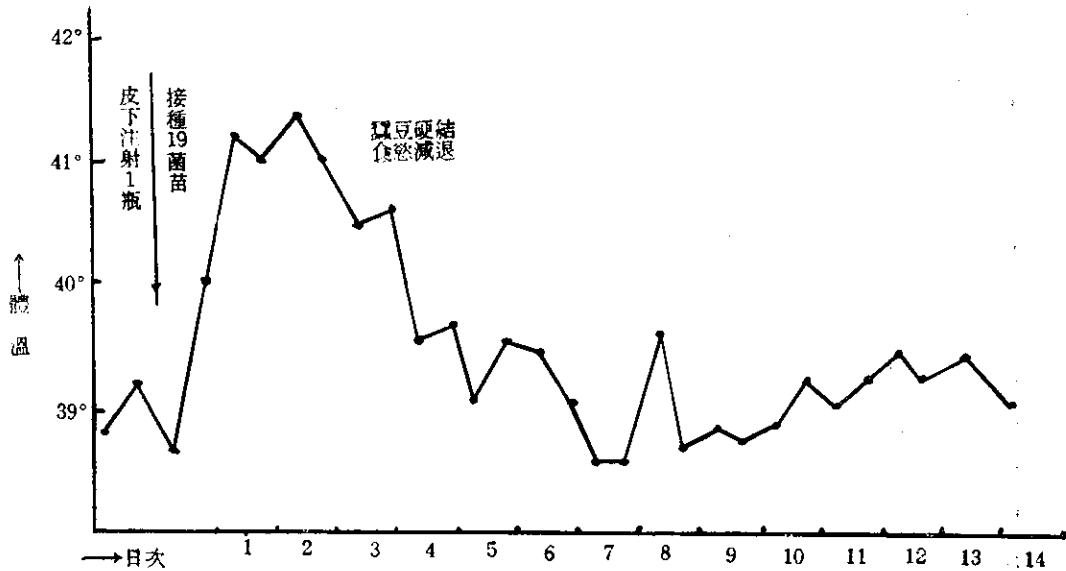


圖 3：小牝牛免疫19菌苗後之體溫變化之一例

Fig 3: One Case of Temperature change curve of immuned calf

接種菌苗之局部均於注射後第一天起大部發生大小不等之腫結，持續6~7天才消退。全身反應於免疫後第6~7天內有一部分牛有食慾減退或無食慾之情況發生，但均持續3~4天即恢復正常。免疫後之熱反應及局部反應統計如表2。接種免疫之50隻小牝牛除其中3頭（6%）之體溫上升較低只達40.8°C左右，其餘47頭（94%）最高體溫均達41°C以上。局部之腫結除其中6頭無出現外，其餘44頭（88%）均有蠶豆大至手掌大之腫結。

表 2：小牝牛免疫後之熱反應及局部反應

Table 2: The reaction of immuned calves by Br. abortus 19 strain vaccine

接種牧場 頭數	免疫後最高熱反應				注射部之反應				
	40~41°C	41~41.5°C	41.6~42°C	42°C以上	無反應	蠶豆大腫	蛋大腫結	手掌大腫	
味全牧場 30隻	1	7	20	2	4	7	12	7	
義美牧場 20隻	2	1	10	7	2	2	8	8	
合計 50隻	6%	16%	60%	18%	12%	18%	40%	30%	

小牝牛於免疫注射試製成之19菌苗之前及免疫後第3天、7天、14天、21天，1個月及其後每隔1個月均各採血一次，經分離血清及非動化後，以試管凝集反應法測定血清中凝集抗體昇降之情形。其測出之力價依二牧場而分別作對數之平均，免疫接種前除味全牧場1頭為 $\times 10$ 及2頭 $\times 5$ 外其餘47頭均為 $\times 0$ ，免疫後第3天凝集力價上升甚緩，二牧場之平均各為 $\times 2$ 及 $\times 3.5$ ，免疫後第7天凝集抗體價急劇上升，二牧場之平均力價各為 $\times 206.3$ 及 $\times 190.3$ ，免疫後第14天凝集抗體價上升至最高峰，二牧場之平均分別為 $\times 611$ 及 278.5 ，然後於免疫後第21天凝集抗體價即下降，其後更隨時間而緩緩下降。

，至免疫後第5個月，義美牧場除3頭×5外均下降到零，第6個月則全部消失為零，味全牧場則於免疫後6個月除7頭外亦均降到零，其平均為 $\times 1.9$ ，二牧場之凝集抗體力價詳如圖4及圖5。

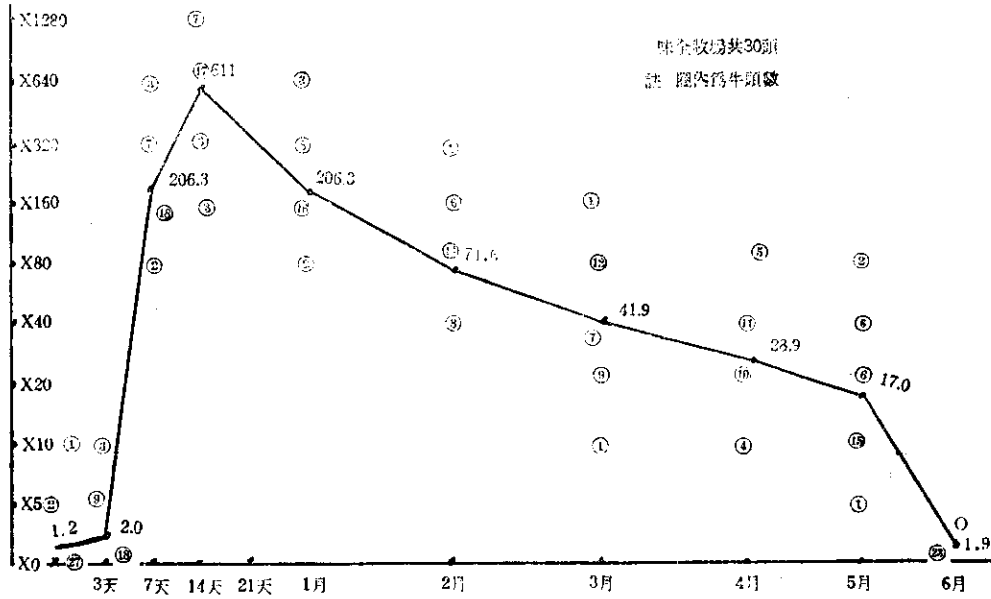


圖4：小牛免疫後凝集抗體價之分佈及平均曲線

Fig 4: The Curve of agglutinative titer of immuned calves by Br. abortus 19 strain vaccine (A group)

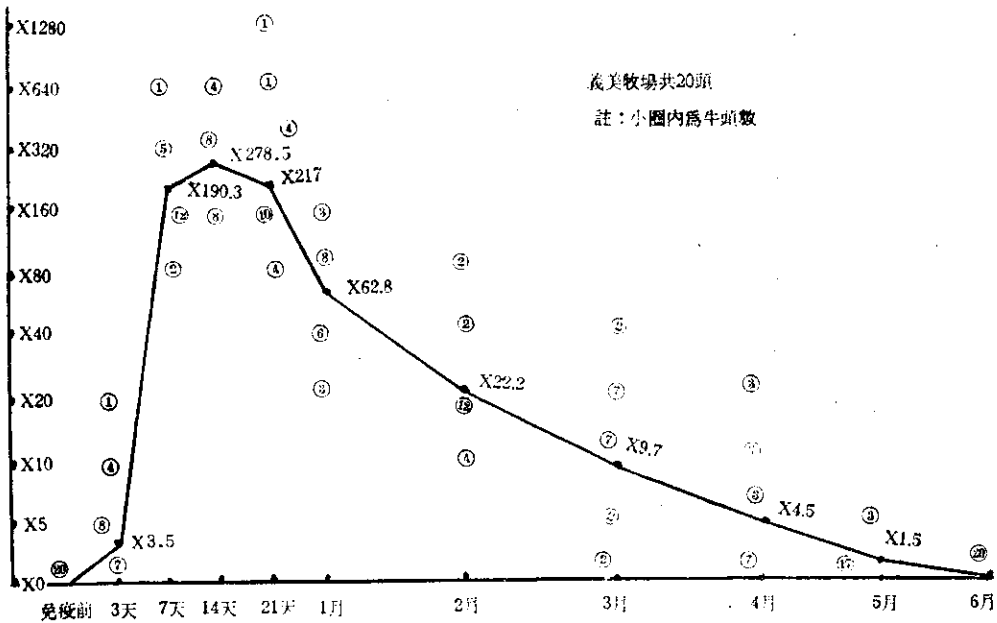


圖5：小牛免疫後凝集抗體價之分佈及平均曲線

Fig 5: The Curve of agglutinative titer of immuned calves by Br. abortus 19 strain vaccine (B group)

討 論

牛布氏桿菌19號菌苗在外國使用多年以來，雖曾有以此菌苗免疫經一年後複分離得疑似19號菌之存在牛體，並使牛之血清抗體價升高之報告 (17, 11, 10) 但據 Jones 1965 報告 (7) 由於布氏桿菌19號菌苗在培養上有其特殊之性質，它在含有 thionin blue (1:500,000) 或 penicillin (5u/ml) 等之培養基中不會發育，尤其在含有 erythritol (1mg/ml) 之培養基中更是唯一敏感不會發育之布氏桿菌株 (3)，故與其他野外布氏桿菌株之區別上不致有困難，另加血清學上之各種檢查方法 (5, 6) 則辨明免疫牛與自然感染牛應不會發生困擾，當然進一步之研究及檢討仍然是必需的。

經試製成之牛布氏桿菌19號菌苗經作野外試驗結果，小牝牛免疫注射後其免疫抗體在第3天開始上升，至免疫後第6個月幾乎均消失殆盡，雖有數頭例外，但均在第7或第8個月消失，故以4—8個月齡之小牛經以本菌苗免疫後，對現行每年牛隻定期血然檢查以淘汰自然感染牛之政策，如於牛齡1年半以後施行，則不致有任何影響及困擾。

參 考 文 獻

1. Baker, J. R. & Faull, W. B. 1967. : Brucellosis in a large dairy herd. Vet. Rec. 81 : 560-564,
2. Campbell, A. D. and Rodwell, A. W. 1945 : The relationship of dosage and site of inoculation to the agglutinin response to Brucella abortus Strain 19 vaccine : A comparison of the subcutaneous intracutaneous and intracaudal routes. J. Comp. Path. & Therap., 55 : 277
3. G. M. Brown, DVM : E. L. Love 1972 : D. E. Pietz, DVM : C. R. Ranger : Characterization of Brucella abortus strain 19. Am. J. Vet. Res., Vol. 33, No. 4, 759-764.
4. Dick, J. R. Venzke, W. G., and York, C. 1947 : A method for differentiation between vaccinal titers and infection titers of Brucella abortus in cattle. J. A. V. M. A., 111 : 255-258.
5. Hill, W. K. W. 1963 : Standardization of the complement fixation test for Brucellosis. Bull. Off. Int. Epiz. 60 : 401.
6. Jones, Lois M., Hendricks, J. B. and Berman, David, T. 1963 : The standardization and use of the complement-fixation test for Diagnosis of Bovine Brucellosis, with a review of the Literature. Am. J. Vet. Res, 24 : 1143 : 1151.
7. Jones, L. M., Montgomery, Virginia, and Wilson, J. B. 1965 : Characteristics of CO₂-independent culture of Brucella abortus isolated from cattle vaccinated with strain 19. J. Infect. Diseases 115 : 312-320.
8. King, N. G., and Frank, N. A. 1961 : Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 Br. abortus vaccine. J. A. V. M. A. 139 : 100-103.
9. Lambert G., Amerault, T. E., Manthei, C. A., and Goode, E. R., Jr. 1961 : Immunogenic response of calves vaccinated at different ages with Br. abortus St. 19. 93-99, Proc. U. S. Livestock San. A.
10. Lambert G., B. L. Deyse, and G. M. Painter 1964 : Postvaccinal persistence of Br. abortus strain 19 in two bulls. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc., 45 : 909.

11. Margaret E. Meyer and C. J. Nelson 1967 : Recovery of *Br. abortus*, strain 19 from immunized cattle. 71st Annual Meeting USLSA Oct.
12. Manthei, C. A., Mingle, C. K., and Carter, R. W. 1952 : Comparison of immunity and agglutinin response in cattle vaccinated with *Br. abortus* strain 19 by the intradermal and subcutaneous methods. 100—114, Proc. 56th Ann. Meet. U. S. Livestock San. A.
13. Manthei, C. A. 1953 : Review of suggested method for differentiation of vaccinal and infection serum agglutination titers for Brucellosis in cattle. 135-143, Proc. 57th Ann. Meet. U. S. L. S. A.
14. McDarmid, A. 1956 : A comparison of the immunizing value in cattle of dead antigen and strain 19 *Br. abortus* vaccine. *Vet. Rec.* 69 : 877.
15. Nicolletti, Paul and Muraschi, T. F. 1966 : Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the Diagnosis of Brucellosis in problem cattle herds. *Am. J. Vet. Res.*, 27 : 689-694.
16. Nicoletti, Paul 1969 : Further evaluations of serologic test procedures used to Diagnose Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 30 : 1811-1816.
17. Nicoletti, Paul and M. G. Fincher 1966 : The recovery of *Br. abortus* strain 19-like organisms A case report. *Cornell Vet.* Vol. LVI No. 2.

Studies on the Production of Br. abortus Strain 19 Vaccine and its Immune Response in Cow

Wu Yishing, J. S. Lai, T. K. Chang, S. C. Yang

Summary

Brucella abortus Strain 19 introduced from United States Department of Agriculture was cultured on potato infusion medium for 72 hours. After purify test, counting of bacteria number and adjustment of concentration, the harvested culture was added with equal volume of medium and then was lyophilized as vaccine. After that vaccine assayed for purify and vaccine examination, then the vaccine product was examined for identity test with international standard *Brucella abortus* serum and showed satisfactory result.

The preservation test of living bacteria contained in the vaccine was checked and after the vaccine lyophilized, the number of living bacteria was decreased to 1/6-1/10. The vaccine product was then divided into three groups: ice room (-5° to -20° C), refrigerator (4° to 10° C) and room temperature (20° to 30° C) for preservation. At interval of every two months, the test was held by counting the living bacteria number. It showed that the group kept at room temperature showed bad result and the group kept at ice room or refrigerator for one year only dropped the bacteria number to one sixth of original.

Guinea pigs and rabbits injected with these vaccine showed no reaction for two weeks observation. The agglutination titer of the inoculated rabbits' sera reached X320 at 7 days postinoculation, then the titer dropped down slowly and disappeared completely after 5 months, but the CF test titer still kept X20 at 5 months postinoculation.

The vaccine was solved and inoculated 4-8 months old calves of two farms for a field trial. The vaccinated calves mostly showed local showed and higher body temperature as well as bad appetite for a short time, but those disappeared completely 7 days postinoculation and all calves recovered. The agglutination titer of calves' sera began to increase at 7 days postinoculation and reached X611 and X278 at 14th day in both farms. Then the titer dropped slowly and disappeared entirely after 6 months.