

# 家禽霍亂雞胚胎菌苗之研究

## (I) 菌苗之製造及免疫效力之比較

楊喜金 劉煥炎 呂榮修 劉義雄

台灣省家畜衛生試驗所

### 一、緒 言

家禽霍亂菌苗之製造試驗始自1880年巴氏德氏之研究，該試驗實為細菌性預防液試驗之開端，亦為奠定其後有關人工免疫知識之基礎。後來有關家禽霍亂菌苗的研究者為數甚多，如活菌苗、加熱菌苗、福馬林菌苗、Chrome 菌苗、Saponin 菌苗、雞胚胎菌苗、氫氧化鋁膠 (Aluminum hydroxide gel Vaccine) 菌苗、Alumina 沈澱菌苗、及油類添加菌苗等，此等菌苗依研究者及追試者之意見而不一<sup>(1)</sup>。

1950年Carter<sup>(2)</sup>氏謂雞胚胎菌苗對白痢之效力遠較肉羹菌苗為良。而Dougherty<sup>(3)</sup>氏亦謂雞胚胎菌苗對小鴨的免疫效力亦比肉羹菌苗及市售菌苗為良，即經菌苗接種四星期後之鴨群有83%之效力，但否定雞胚胎菌苗之效果者亦有之。

筆者等曾試以氫氧化鋁膠吸着感染雞胚胎製成菌苗，其效力經屢次試驗結果成績極佳，茲將其試驗成績報告於後，希各先進多賜指正。

### 二、試驗材料及菌種之選擇

#### (1) 材料

1. 孵化10—12天之雞胚胎。
2. 每cc.中含有33mg之氫氧化鋁膠 (Aluminum hydroxide gel)<sup>(4)</sup>。
3.  $\frac{1}{15}$ Mol之磷酸鈉生理食鹽水<sup>(4)</sup>。
4. 藥局方福馬林。
5. 供試用健康雞隻。

#### (2) 製造用菌株之選擇

##### 1. 菌株之種類：

筆者等所使用之菌株計有章、台北、彰化、台南、高雄及關渡株，前五株為本所以往使用之製造菌種，而關渡株則在淡水附近之鴨群中所分離，經細菌學上之鑑別認為家禽霍亂菌，同時其毒力很強者。

##### 2. 菌株之保存及繼代：

供試用菌株以血液寒天純粹培養後，放入4°C之冰箱內保存，每10—15日繼代一次。

##### 3. 菌株毒力之測定：

製造用菌株其毒力之強弱與菌苗之效力有着密切的關係，所以筆者等在菌苗製造前先測定菌種之毒力，其測定法以 Acriflavin test 法及對雞胚胎之致死毒力測定之。

Acriflavin test 法是把培養20小時之家禽霍亂菌 (*P. multocida*) 生理食鹽水混懸液1滴與1滴新配一星期以內之1:1000之Acriflavin蒸餾水溶液在乾淨的玻璃片上均勻混和，混合後其混和面呈顆粒狀者為粗糙型(如雞白痢急速凝集反應之陽性者)，然其混和面之顆粒呈細小均勻者為平滑型，據Carter氏<sup>(5)</sup>謂Acriflavin test 法中呈平滑型者其毒力遠較粗糙型之毒力為強。上述六株供試菌種經Acriflavin test 後均認為是平滑型的。

至於對雞胚胎之毒力測定則將純粹菌種培養在試管肉羹中，而放在 37°C 之孵化器內培養 20 小時後，用滅菌生理食鹽水作 10 進法稀釋，而取其 0.1c.c 各注入孵化 10 日的雞胚胎尿膜腔內，每一稀釋單位注入五個雞胚胎，然後觀察其對雞胚胎致死之數目及時間，而來決定其對雞胚胎之毒力，結果這六株供試菌種對雞胚胎之毒力都很強。

### 三、各種滅毒藥品對 *P. Multocida* 的敏感度

筆者等爲了要明瞭各種滅毒藥品對家禽霍亂菌的滅毒情形，所以選了 Formalin、Merzonin (Sodium-ethyl-mercuri Thiosalicylate)、Phenol、Malachite green 及 Gentian Violet 作試驗，其測定方法把 *P. Multocida* 肉羹培養 20 小時之培養液，各分注 4.5c.c 於滅菌試管中，然後各種滅毒藥品 0.5c.c 注入第一管作 10 進法稀釋除 Formalin 及 Phenol 第一管放入原液外其餘 Merzonin、Malachite green 及 Gentian Violet 等以其 1% 液注入第一管作 10 倍稀釋。稀釋完畢後分兩組觀察，一組放入 4°C 之冰箱內感作，另一組放入 37°C 之孵化器內感作 12、24、48、72 小時各分別取其感作液，培養在試管固體寒天中檢查其發育情形，另外放一支沒有加任何藥品的作爲對照，其所得結果如下表：

表 1 各種滅毒藥品對 *P. Multocida* 之敏感度

感作別 藥品稀釋倍數 感作藥品	37°C 孵化器內感作						4°C 冰箱內感作						對 照	
	感作 小時	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>	感作 小時	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup> 10 <sup>-6</sup>		
Formalin	12	-	-	-	+	+	12	-	-	-	+	+	+	+
	24	-	-	-	+	+	24	-	-	-	+	+	+	+
	48	-	-	-	+	+	48	-	-	-	+	+	+	+
	72	-	-	-	+	+	72	-	-	-	+	+	+	+
Phenol	12	-	-	-	+	+	12	-	-	-	+	+	+	+
	24	-	-	-	+	+	24	-	-	-	+	+	+	+
	48	-	-	-	+	+	48	-	-	-	+	+	+	+
	72	-	-	-	+	+	72	-	-	-	+	+	+	+
Malachite green	12			+	+	+	12			+	+	+	+	
	24			+	+	+	24			+	+	+	+	
	48			+	+	+	48			+	+	+	+	
	72			+	+	+	72			+	+	+	+	
Merzonin	12			-	-	+	12			-	-	+	+	
	24			-	-	+	24			-	-	+	+	
	48			-	-	+	48			-	-	+	+	
	72			-	-	+	72			-	-	+	+	
Gentian Violet	12			+	+	+	12			+	+	+	+	
	24			+	+	+	24			+	+	+	+	
	48			+	+	+	48			+	+	+	+	
	72			+	+	+	72			+	+	+	+	

註 1. - 經培養檢查認爲 *P. Multocida* 陰性。

註 2. + 經培養檢查認爲 *P. Multocida* 陽性。

依上表成績所示，37°C 孵化器感作及 4°C 冰箱感作的滅毒情形相同，滅毒 12 小時與 72 小時者亦無異。依其感作藥品看來 Malachite green 及 Gentian Violet 之 1 : 1000 液都不能使 *P. Multocida* 致死。而 1 : 1000 之 Phenol 稀釋雖能殺死 *P. Multocida*，但 1 : 1000 之 Phenol 還會使雞胚胎乳劑變爲白色。故 1 : 1000 之 Phenol 液用做此菌苗之滅毒似不理想。至於 Merzonin 之殺菌力在此五種藥品中可算最強，以後仍有再試驗之必要。筆者等依上表試驗結果認爲家禽霍亂雞胚胎菌苗之滅毒還是以 Formalin 較爲理想，所以本菌苗之製造試驗，筆者等一直以 Formalin 來滅毒。

#### 四、菌苗之製造

##### (1) 雞胚胎菌苗 (Chicken embryo Vaccine)

供製造用菌種從純粹之血液培養基中鈎菌培養在試管肉羹裏 (但 Carter 氏則以 Tryptose broth 培養) 然後放入 37°C 之孵化器內培養 8 個小時, 而取其 0.1c.c 注入 10 日雞胚胎尿膜腔內, 而俟雞胚胎致死後, 取其尿液行第二次接種, 仍然注入第 10 日雞胚胎尿膜腔內, 如此反覆注射到第三次時其毒力則漸增強, 製造時將第三次接種之尿液 0.1c.c 注入發育 12 日的雞胚胎尿膜腔內, 其胚胎致死後無菌操作採取胚胎製成 1 : 5 — 1 : 10 之乳劑, 然後用 Formalin 滅毒後即成也。

##### (2) 雞胚胎氫氧化鋁膠菌苗 (Aluminum hydroxide gel Chicken embryo Vaccine 簡稱 A H G Chicken embryo Vaccine)。

將上面之 Chicken embryo Vaccine 加入等量之 Aluminum hydroxide gel 即成也。

##### (3) 雞卵培地氫氧化鋁膠菌苗 (A H G Egg agar Vaccine)

於 PH7.4 之普通寒天培地中加入新鮮全卵, 使總量成 10% 然後均勻混和靜置使其凝固在平底燒瓶中, 製造時以普通 Broth 培養 20 小時之 P. multocida 菌液, 每平底燒瓶中注入 0.5c.c 使菌液均勻擴展在寒天面, 放入 37°C 之孵化器中培養 20 小時, 然後每個平底燒瓶寒天注入 15c.c 之滅菌生理鹽水, 輕輕搖動, 洗取發育的菌膜, 所得到的菌液以滅菌紗布過濾, 而集於滅菌的大燒瓶中, 再把此濃厚之菌液稀釋成每 c.c 含有 60—160 億濃度之菌液, 最後加入總濃度 0.2% 之 Formalin, 在室溫滅毒 48 小時, 而加上等量之氫氧化鋁膠即成也。

##### (4) 氫氧化鋁膠尿液菌苗 (A H G Allantoic fluid Vaccine)

接種 P. multocida 之雞胚胎斃死後, 所採取尿液加上 0.2% 總濃度之 Formalin, 滅毒後加上等量之氫氧化鋁膠即成也。

##### (5) 氫氧化鋁膠福馬林菌苗 (A H G Formalized bacterin)

比照目前所使用之福馬林肉羹菌苗, 菌濃度使成 Mc Farland 第 8—9 支, 後加入總濃度 0.2% 之 Formalin 滅毒, 再混上等量之氫氧化鋁膠者。

#### 五、試驗方法

##### (1) 各種菌苗對雞隻之效力比較:

筆者等將上述五種菌苗用雞隻測定其免疫效力, 每次所供試雞隻都從淡水附近購入者, 而成雞肌肉內注入 2 c.c, 菌苗接種後觀察兩星期, 第 14 日供試雞隻及對照組均肌肉注入 10M.L.D. 1c.c 之 P. multocida 培養 20 小時菌液 (關於攻擊 Strain 之稀釋據 Carter<sup>(2)</sup>謂 Danielson 以 1% 滅菌 Peptone 水稀釋, 結果比滅菌生理食鹽水稀釋為好), 經強毒攻擊之雞隻繼續觀察 14 日, 其所得的成績如表 2。

表 2. 各種菌苗對雞隻免疫效力的比較

Table 2. Comparison immunizing value of fowl cholera vaccine in chickens.

Preparation	Dose c.c	Experiment animals	Survival number	Percentage
Chicken embryo vaccine	2 c.c	Adult chickens	2/5	40 %
A H G Chicken embryo vaccine	"	"	7/9	77.7%
A H G Egg agar vaccine	"	"	2/5	40 %
A H G Allantoic fluid vaccine	"	"	3/5	60 %
A H G Formaline vaccine	"	"	3/5	40 %
Control	10M.L.D. 1c.c	"	0/5	0 %

註1. 分母爲供試鷄隻。Denominator : number of animals used.

2. 分子爲強毒攻擊後健存隻數 Numerator : number of survivors.

依上表所示 A H G Chicken embryo vaccine 對鷄隻之效力遠較其他數種菌苗爲良。

(2)各批 A H G Chickek embryo vaccine 對鷄隻之免疫力價：

筆者等把各批 A H G Chicken embryo vaccine 對鷄隻的免疫成績列於下表。

表3 鷄胚胎氫氧化鋁膠菌苗對鷄隻之免疫效力

Table 3. Immunizing Value of A H G Chicken embryo vaccine in chickens.

Preparation	Dose c.c	Survival number	Percentage
Lot 10	2 c.c	4/5	80%
Lot 13	2 c.c	7/9	77.7%
Lot 14	2 c.c	4/5	80.0%
Lot 15-6	2 c.c	7/9	77.7%
Lot 17	2 c.c	5/7	71.4%
Lot 24	2 c.c	7/8	87.0%
Control	10M.L.D. 1c.c	0/5	0%

依上表所示 A H G Chicken embryo vaccine 對鷄隻之免疫效力都保持着70—80%之間。

(3)攻擊毒之測定：

筆者等爲了測定攻擊毒力的正確起見，曾以體重15gm之白鼠及三箇月中鷄作毒力檢定比較，注射的材料爲培養20小時的肉羹菌液10進法稀釋後，白鼠每隻從皮下或腹腔內注入0.1c.c，三箇月中鷄則肌肉內注入1.0c.c，所得成績如表4。另外一組是小白鼠與菜鴨間的毒力比較，小白鼠體重每隻15gm，菜鴨約兩台斤之成鴨，所得成績如表5。

表4 家禽霍亂菌對白鼠及中鷄間M.L.D.之比較

試驗動物	劑量c.c	稀 釋 倍 數						備 考
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
白 鼠	IP 0.1c.c	●●	●●	●●	○○	○○	○○	關 渡 株
中 鷄	IM1.0c.c	●	●	●	●	○	○	

註 ●記號爲斃死隻數。I.P：腹腔內注射。

○記號爲健存隻數。I.M：肌肉內注射。

由此表所示白鼠之1 M.L.D.爲10<sup>-6</sup>之1.0c.c，中鷄之1 M.L.D.亦爲10<sup>-6</sup>之1.0c.c，故筆者等目前對試驗鷄隻之攻擊，有時採用白鼠之10M.L.D.爲準。

表5 家禽霍亂菌對白鼠及鷄鴨間M.L.D.之比較

試驗動物	劑量c.c	稀 釋 倍 數						備 考
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
白 鼠	I.P0.1cc	●●	●●	●●	●●	○○	○○	章 株
菜 鴨	IM1.0cc	●	●	●	○	○	○	

由此表所示體重15gm之白鼠之1 M.L.D.爲10<sup>-7</sup>之1c.c，而鴨之1 M.L.D.爲10<sup>-5</sup>之1.0c.c，兩者間M.L.D.之相差爲100倍，如果供試鴨隻之攻擊毒以其10M.L.D.爲準時，則使用白鼠之1000

M.L.D.即可。

## 六、結 論

1. 依表 1 所示各種滅毒藥品對 *P. Multocida* 之敏感度，以 Formalin 爲最優，Merzonin 之滅毒情形雖很強，但對於菌苗的效力上是否有利，須待以後之試驗。至於 Phenol、Malachite green 及 Gentian Violet 似無應用價值。

2. 依表 2 所示各種菌苗對雞隻之免疫效力比較結果，以 A H G Chicken embryo vaccine 爲最優，A H G Allantoic fluid vaccine 爲次之，A H G Egg agar vaccine、A H G Formalized bacterin、Chicken embryo vaccine 則較差。

3. 依表 3 所示 A H G Chicken embryo vaccine 各批對雞隻之免疫效力通常保持 70~80%。

4. 依表 4 所示 15gm 白鼠之 M.L.D. 與三個月中雞之 M.L.D. 一致。而表 5 之成績又得悉，15gm 之白鼠與成鴨（菜鴨）間之 M.L.D. 相差 100 倍。

本試驗經費承蒙農復會之補助，技術上又蒙本所黃所長文池之指導，特此致謝。

## 參考文獻

1. EIHYO RYU : Studies on *Pasteurella multocida* (IV) Jap. J. Vet. Scien., VOL. XXI. No.5 1959.
2. CARTAR G. R. : Studies on *Pasteurella multocida* Chicken embryo Vaccine (1) Am. J. Vet. Res., VOL. XI. No.40 (1950)
3. DOUGHERTY E. : The efficacy of several immunizing agents for the Control of fowl Cholera in white Pekin ducks. Cornell Vet., 43, 421, 1953.
4. 林再春：肌肉注射用新城雞瘟疫苗製造之研究。台灣省政府農林廳獸疫血清製造所研究報告第二卷 (1958)
5. CARTAR G. R. : Studies on *Pasteurella multocida* (II) Am. J. Res., 18. 210 (1957)

## Study on Production of Fowl Cholera Vaccine

(1) The production of Fowl Cholera chicken embryo vaccine and comparison immunizing value in Chicks.

S. C. Yang, J. Y. Liu, Y. S. Lu, I. S. Liu

Taiwan Provincial Institute of Animal Health

1. Of Several vaccines tested A. H. G. Chicken embryo vaccine showed better results than A. H. G. allantoic fluid vaccine, A. H. G. egg agar vaccine, Chicken embryo vaccine and A. H. G. formalinized bacterine.

2. The A. H. G. Chicken embryo vaccine usually protected 70~80% against Challenge with 10 M.L.D. of *Pasteurella multocida*.