

放線桿菌胸膜肺炎不活化菌苗之研發

張惟茗^{*}、林敬覆、吳義興、蕭終融

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為進行放線桿菌胸膜肺炎不活化菌苗之研發，種菌之選殖共測試包括 21 株第 1 血清型分離株及分屬第 1、2、5 及 11 血清型之 4 株標準株等菌株共 25 株，所有分離菌株均先經生化試驗及血清學同定確認。菌株之篩選主要針對 ApxI 細胞毒素之分泌量及菌落型態進行篩選。ApxI 細胞毒素之檢測則以酵素免疫斑點法(使用抗 ApxI 毒素單源抗體檢測)及溶血力價測定等兩種方式進行。在 25 株菌株中，21 株為平滑型菌落，2 株為粗糙型，2 株為黏液型。以酵素免疫斑點法檢測菌株之 ApxI 毒素分泌，結果力價之分布由陰性至 1：256，差異相當大。菌株溶血力價之分布則由陰性至 1：32。不同菌株在酵素免疫斑點法力價或溶血力價與培養於血液培養基所產生之溶血圈大小一致。最後選殖之種菌為第 1 血清型分離株，菌落為黏液型，酵素免疫斑點法力價及溶血力價分別為 1：256 及 1：32。以豬胸膜肺炎放線桿菌第 1 血清型種菌進行大量培養所得之菌液，再利用硫酸銨濃縮後檢測其毒素含量減少低於 10%，但是毒素活性卻大幅降低，減少超過 90%。將菌液不活化後添加商品化油質佐劑之試製菌苗所進行之特性試驗，純粹試驗、無菌試驗及安全試驗等之結果均符合動物用藥品檢驗標準之規定。試製菌苗所進行之效力試驗，計算試製菌苗之防禦指數為 1.41，高於標準。

關鍵字：胸膜肺炎放線桿菌，毒素，疫苗

緒 言

胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, Ap) 屬一種溶血性革蘭氏陰性菌，感染後可引起豬出血性纖維素性胸膜肺炎。台灣在 1976 年首次報告以來 [2]，目前已蔓延全省，發生率極高。1981 年在生長肥育豬調查中，發現以本病之感染為最主要 [3]。而本菌血清型的複雜和其它細

菌、病毒的混合感染使得本病更難控制，也造成極大之經濟損失，因此本病的控制亟待解決。抗生素的使用雖可延遲本病的發生和降低感染豬的死亡率，但一旦停藥，本病將再度爆發。因此本病的防治應以疫苗免疫為主。但一般不活化菌苗往往僅能減少豬群的死亡率，而不能阻止慢性感染 [4]。由於在 Ap 的致病機制中，毒素不但扮演著重要的腳色同時也是重要的保護抗原，實驗顯示豬免疫兩次含 Apx 細胞毒素及 transferrin-binding proteins 的次單位疫苗，能有效保護

^{*}抽印本索取作者

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

豬耐過 Ap 的攻擊及減少肺部病變 [8]。因此本實驗之目的即在於研發添加重要毒素的菌苗，希望對於本病之防治能有所助益。

材料與方法

菌株、培養方法與細胞毒素製備

所使用的菌株共 25 株，包括 21 株 Ap 第 1 血清型分離株及 4 株分屬第 1、2、5 及 11 血清型之標準株 (ATCC27088, 27089, 33377, 53153)，所有分離菌株均經生化試驗及血清學同定確認。細菌培養方法是接種於含 0.01% NAD 之 tryptic soy broth (DIFCO)，或含 0.01% NAD 及 5% 脫纖綿羊血之 tryptic soy agar (DIFCO) 置於 37°C、10% CO₂ 之恆溫培養箱培養 18 個小時。培養於固體血液培養基之菌落需觀察型態及溶血圈大小。細胞毒素製備是將 25 株菌株培養後的培養液，以 7000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，再以 0.45μm 過濾膜過濾後進行下述力價分析。

細胞毒素之濃縮與粗純化

細胞毒素製備是將培養液，以 7000 rpm 離心 15 分鐘後取上清液，再進行濃縮與粗純化。硫酸銨濃縮是將上清液 1000 mL 緩緩加入等量飽和濃度的硫酸銨溶液 (767g/L, 25°C)，4 °C 下攪拌 2 個小時，再以 7000 rpm 離心 30 分鐘。將沉澱物以蒸餾水再溶解後裝入透稀袋中 (MWCO 12000-14000) 以 0.15 M 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 透析，此即為濃縮之細胞毒素。所得之濃縮液再分別以斑點免疫法檢測毒素量，以溶血試驗檢測毒素活性。

酵素免疫斑點法 (dot blot assay)

將製備之 25 株菌株的細胞毒素作 2 倍階梯稀釋後取 0.1 mL，使用 96 孔 Bio-dot (Bio-Rad) 滴於硝化纖維紙 (0.45μm nitrocellulose paper, Schleicher & Schuell) 上，烘乾後浸泡於填塞溶液 (含 10% 脫脂奶之 0.15M PBS) 37 °C、15 分鐘後，以清洗液 (0.05% Tween 20 in 0.15M PBS) 清洗 3 次後，用稀釋 1000 倍之 Ap 抗細胞毒素 (ApxI) 單源抗體 (老鼠腹水) 在 37 °C 下感作 30 分鐘。接著再以清洗液清洗 3 次後 (每次 15 分鐘)，與稀釋 1000 倍之抗鼠 IgG 過氧化氫 (horseradish peroxidase, HRP) 標示抗體

(Jackson) 感作 (37 °C、30 分鐘)。再以清洗液清洗 3 次後，最後以 3-3'diaminobenzidine (0.1% in 0.05 M Tris buffer) (Sigma) 呈色後判定。

溶血試驗

溶血試驗是將製備之 25 株菌株的細胞毒素取 0.5 mL 後，以 barbitone-buffered saline 作兩倍稀釋，再加 0.5 mL 溶於 barbitone-buffered saline 之 0.5 % 綿羊紅血球溶液。充分振盪混合後，先置 37 °C、1 小時，再置於 4 °C、1 小時後判定。

細胞毒素免疫原之製備及免疫

細胞毒素免疫原之製備是將上述細胞毒素溶液 1000 mL 緩緩加入等量飽和硫酸銨溶液 (767 g/L, 25 °C)，4°C 下攪拌 2 個小時，再以 7000 rpm 離心 30 分鐘。將沉澱物以 100mL 蒸餾水再溶解後裝入透稀袋中 (MWCO 12000-14000) 以 0.15 M 磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 透析，即為濃縮 10 倍之細胞毒素免疫原。

不活化菌苗之製備

將培養所得之菌液添加 0.3 % 福馬林，置於 37 °C 作用 1 小時，進行不活化。細菌及細胞毒素之濃縮與粗純化採用上述方法進行。細菌最終濃度約為 10¹⁰ pfu/mL，佐劑選用商品化油質佐劑 Emulsigen® (MVP)，與抗原比例為 1 : 4。

試製不活化菌苗之特性試驗、純粹試驗及無菌試驗

將試製完成之菌液觀察外觀，抽取部份以革蘭染色進行菌體鏡檢，並分別以巧克力培養基及 Tryptic soy agar 培養，以進行特性試驗及純粹試驗。不活化後之菌液及混合佐劑後之試製不活化菌苗再分別接種 Soy bean casein digest (TSB) 及 Fluid thioglycolate (THIO) 培養液進行無菌試驗。

安全試驗

以體重約 12 公克健康小白鼠 40 隻，各以試製不活化菌苗腹腔接種 0.5 mL，另取 40 隻為對照，觀察 2 週。另以體重約 350 公克健康天竺鼠 2 隻，各以本劑皮下接種 1 mL，觀察 10 日。

效力試驗

將安全試驗合格之免疫小白鼠，分成四組，各組分別以強毒菌株培養液之 10^0 至 10^{-3} 四階段菌液接種腹腔攻擊；對照小白鼠亦分成四組，各組分別以 10^{-1} 至 10^{-4} 四階段菌液接種於腹腔內，觀察一週，計算 LD_{50} 及防禦指數。

結 果

實驗中所測試的 25 株菌株的菌落形態及培養特性均符合 Ap 的特性，使用標準血清型抗血清也都能產生特異性凝集。其中 21 株菌株之菌落型態屬於平滑型，2 株分離株屬粗糙型，2 株分離株屬於黏液型。在含脫纖綿羊血之血液培養基中，不同菌株之溶血圈大小各不相同，有部份菌株甚至沒有明顯溶血圈。

利用抗 ApxI 細胞毒素單源抗體以酵素免疫斑點法檢測菌株之細胞毒素分泌量，測定結果力價分布介於陰性至 1:256 間，其中陰性佔 24 %，力價 1:2 佔 16 %，1:4 佔 16 %，1:8 佔 16 %，1:64 佔 12 %，1:128 佔 8 %，1:256 佔 8 %。利用溶血試驗所測得之細胞毒素溶血力價介於陰性至 1:32 之間。酵素免疫斑點法力價 1:256 之對應溶血力價為 1:32，1:128 及 1:64 之對應溶血力價為 1:16。菌株在含脫纖綿羊血之血液培養基所呈現之溶血圈大小與酵素免疫斑點法及溶血試驗力價高低一致。綜合以上菌落型態及細胞毒素分泌量，以 Ap 第 1 血清型分離株 8611 為理想的種株，因 8611 屬黏液型菌落型態，溶血圈大、清澈(透明)，酵素免疫斑點法及溶血試驗力價分別為 1:256 及 1:32。

以種菌進行大量培養所得之菌液，再利用 50 % 硫酸銨濃縮後，利用斑點免疫法檢測其毒素含量，結果濃縮後之力價減少低於 10 %。但是利用綿羊紅血球檢測其毒素活性(溶血力價)，結果毒素活性減少超過 90 %。

試製不活化菌苗為微黃乳白懸浮乳劑、無異物及異常氣味。純粹試驗結果，培養後菌液經以革蘭氏染色法鏡檢，可檢視到呈紅色單一型態之短桿菌，以巧克力培養基可培養出單一型態之白色黏液狀小菌落，Tryptic soy agar 培養則呈陰性反應，顯示菌液不含有本菌以外之細菌。不活化後之菌液及添加佐劑後之試製菌苗以 TSB 及 THIO 培養，細菌培養結果均為陰性。以小白鼠及天竺鼠所進行之安全試驗，試製不活化菌苗施打後均無出現死亡情形。小白鼠實驗組於施打後約 1 小時，小白鼠之活動力明顯降低，但 24

小時後觀察已恢復正常。

試製菌苗所進行之效力試驗結果如表一，實驗組以菌液原液攻擊後小白鼠存活 2 隻，稀釋 10 倍菌液攻擊後存活 6 隻，稀釋 100 倍以下則全數存活。對照組以菌液稀釋 10 倍攻擊後小白鼠全數死亡，稀釋 100 倍菌液攻擊後存活 5 隻，稀釋 1000 倍以下菌液攻擊則全數存活。估算試製菌苗之防禦指數為 1.41。因此由特性試驗、純粹試驗、無菌試驗、安全試驗及效力試驗等之結果均符合國家動物用藥品檢驗標準(民國 92 年 01 月 15 日 修正) 第 58 節豬嗜血桿菌苗檢驗標準之規定[1]。

表一. 豬胸膜肺炎試製不活化菌苗之效力試驗結果

攻擊用菌液 稀釋倍數 *	實驗組 % (存活頭數) **	對照組 % (存活頭數) **
10^0	20(2)	ND
10^{-1}	60(6)	0(0)
10^{-2}	100(10)	50(5)
10^{-3}	100(10)	100(10)
10^{-4}	ND	100(10)

* 免疫菌苗後兩週以不同強毒菌株培養液稀釋倍數接種於腹腔內攻擊。

** 小白鼠每組 10 隻，實驗組與對照組比較，防禦力價約為 1.41。

討 論

Ap 引起的主要病變為出血性、壞死性纖維索性肺炎，以 ApxI 細胞毒素或脂多醣接種實驗動物都會引起類似病變。ApxI 細胞毒素及脂多醣內毒素不僅為主要的致病因子也是重要的保護因子。ApxI N-端 40 to 380bp 被證實可中和毒素之溶血反應，由此部位所合成之次單位疫苗具有保護能力，對於不同血清型菌也同時具有交叉保護能力 [7]。因此在 Ap 疫苗種菌的選殖上，ApxI 細胞毒素的分泌量及脂多醣鏈的長度均是一個重要的決定因素。具完整的脂多醣鏈其菌落型態為黏液型，脂多醣鏈變短則菌落型態轉為平滑型，脂多醣的多醣鏈掉落後菌落型態則呈粗糙型。基於以上因素，實驗中疫苗種株選殖是從 25 株本地分離株進行篩選，選殖之種株為黏液型菌落型態，溶血圈大、清澈，酵素免疫斑點法及溶血試驗力價分別為

1:256 及 1:32。

由實驗結果顯示所試製之菌苗在特性試驗，純粹試驗、無菌試驗及安全試驗等之結果均符合國家動物用藥品檢驗標準之規定。試製菌苗所進行之效力試驗，計算試製菌苗之防禦指數為 1.41，高於檢驗標準。但是在菌苗製備時細胞毒素之濃縮過程會使毒素活性大幅衰退，根據先前實驗顯示此種衰退會嚴重影響毒素抗原之保護效果，因此亟待有效方法改善之。

此外由於 Ap 屬於革蘭氏陰性菌，不活化菌苗內富含內毒素，再加上所添加之細胞毒素（外毒素）及佐劑使得試製菌苗之副作用雖然尚符合國家檢定標準但仍有改善空間。而菌苗副作用的降低，在臨床使用上有其重要性。實驗顯示施打菌苗（Ap 及 M. hyopneumoniae）後所產生的副作用，會促使豬感染第 2 型環狀病毒（porcine circovirus type 2, PCV2）後的毒血期、血中病毒量、組織中病毒分布及病變嚴重性都明顯增加 [6]。

菌苗所使用的佐劑是影響其副作用的重要因素。鋁膠及油質佐劑是製造動物疫苗常被使用的佐劑，一般來說它們是相當安全地。但是無可避免地還是會引起程度不一的副作用例如局部組織炎症反應或過敏反應。不同免疫原由於組成不同，引起反應的嚴重性也各不相同。降低內毒素熱原的全身熱反應是鋁膠類佐劑的優點之一，主要機制為降低熱原的釋放及/或鋁離子對於熱原的直接抑制，而氯化鋁的抑制效果較氫氧化鋁強 [5]。但是鋁膠類佐劑誘發之免疫強度及持續性均不及油質佐劑。本實驗中所使用的油質佐劑免疫兔子後產生持續 2 天的發燒及局部發炎及壞死等反應，因此選擇及試用其它更適當之佐劑，可能有助於菌苗副作用的改善。

參考文獻

1. 中華民國動物用藥品檢驗標準」（民國 92 年 1 月 15 日修正）第三章第五八節豬嗜血桿菌苗檢驗標準。http://www.coa.gov.tw/law/lawsystem/down_2/G/8.htm
2. 徐興鎔、翁仲男、周凝元、金約翰、韓海倫。1976。豬嗜血桿菌肺炎在台灣之流行報告。台糖公司畜產研究所 64/65 年期研究試驗報告,191-197 頁。
3. 張靖男、沈詠梅、鐘文彬、嚴家清,1981,生長肥育豬肺炎細菌學之研究,臺糖公司畜產研究所 69/70 年期研究試驗報告,181-188 頁。
4. Fenwick, B.W. et al. 1986b. Mortality in swine herd endemically infected with *H. pleuropneumoniae*: effect of immunization with cross-reacting LPS core antigens of *E. coli*. *Am. J. Vet. Res.* 47:1888-1891
5. Norimatsu M, Ogikubo Y, Aoki A, Takahashi T, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S, Tsuchiya M, Tamura Y. Effects of aluminum adjuvant on systemic reactions of lipopolysaccharides in swine. *Vaccine* 1995 13(14):1325-1329
6. Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallares F, Thacker EL, Brockus CW, Ackermann MR, Thomas P, Meng XJ, Halbur PG. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol.* 2003 Sep;40(5):521-9
7. Seah JN, Frey J, Kwang J. The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6464-7.
8. Van Overbeke I, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2001 Feb;48(1):15-20

Development of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* inactivated vaccine

Chang, WM*, YS Wu, KF Lin and JR Shiau

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive of Yaun

A selection of a seed strain for development of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ap) vaccine was made from 4 type strains and 21 field strains. Among 25 strains, 21 strains were smooth type, 2 were rough type and 2 were mucus type according colony morphology. The criteria of the selection were based on the secretion of ApxI toxin, since it was one of the major factors of pathogenesis, and on colony morphology. The detection of ApxI toxin was made by immnoblotting test and hemolytic test. The distribution of titer by immnoblotting test and hemolytic test were from negative to 1 : 256 and from negative to 1 : 32, respectively. It was coordinated with the hemolytic zone appeared in blood agar cultured. The seed strain selected was a field isolate in 1997 with titer of 1 : 256 and 1 : 32 tested by above tests. The cytotoxin contained in culture supernatant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 was concentrated by salting out of ammonium sulfate. The amounts of cytotoxin were lost less than 10% after concentration process when measured by immuno-blotting assay. However, the biological activity of cytotoxin was decreased greatly for more then 90% when detected by hemolytic test. The physical properties, purity, sterility, and safety of prepared inactivated vaccine with addition of a commercialized oil adjuvant were all fit the national corresponding regulation. The evaluation of protective efficacy of prepared bacterin was done by mice protection test. The protective index was 1.41 and the inactivated vaccine was proved to be effective.

Key words: Actinobacillus pleuropneumoniae, toxin, vaccine

* Corresponding Author
Animal Health Research Institute