

豬胸膜肺炎放線桿菌類毒素不活化菌苗之研發

官南綾、蔡洵洵、黃春申、吳建志、涂堅

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 試製不活化菌苗組成為 AP 1、2、5 及 7 血清型各約 1×10^8 CFU/ml，添加 10 倍濃縮類毒素 ApxI，使用 ISA 25 (O/W) 作為佐劑。通過小鼠的安全試驗後，分別以血清 1 型、2 型、5 型及 7 型強毒株攻毒，其保護指數分別為 1.3、1.0、1.5 及 1.0，符合檢定標準。在豬隻的安全試驗部分，以高劑量 (5 doses; 2 ml/dose) 肌肉注射，除注射部位紅腫外無其他異常；在豬隻的效力試驗部分，以血清 1 型 5×10^7 CFU 攻毒後 24 小時，對照組豬隻全數死亡，實驗組全數耐過且於 72 小時恢復。以溶血抑制試驗，配合針對 AP 菌共通抗體及 AP 分型抗體之 ELISA 套組檢測豬隻抗體爬升情形，結果顯示 ApxI 抗體及 AP 菌共通抗體在補強免疫後明顯爬升；然 AP 分型抗體檢測結果卻不盡相同，在攻毒當週抗體陽轉率為 0-100%，推測同一血清型中仍存有菌株間的變異。試產三批不活化菌苗皆通過安全試驗，但效力試驗有一批不合格。

關鍵字：豬胸膜肺炎放線桿菌、類毒素、不活化菌苗

緒言

胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*; AP) 為一無運動性，兼性厭氧之革蘭氏陰性球桿菌，其對豬具有宿主專一性，所有年齡的豬隻皆有感受性，但一般以 12 週齡左右的豬隻影響最大[5]。為造成豬隻壞死性、纖維素性肺炎及胸膜與肋膜炎的主要病原。世界各國主要流行的血清型不同，整體而言，北美洲主要是以血清 1 型及 5 型為主，而歐洲則是以 2 型及 9 型為主；而台灣自 1976 年首有報告以來，是以 1 型 (80.3%) 為主，其次為 5 型 (12.6%)，2 型 (3.2%) 及 7 型 (3.2%) [3]。

依據脂多醣及莢膜的多醣結構的差異性，目前已知有 15 種血清型，彼此之間並無交叉保護性。若是以對於 Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 的需求差異性，又可區分為兩種 Biotype：除了第 13 及 14 血清型生長不需要 NAD 以外，其餘血清型皆屬於 NAD 依賴型[2]。AP 的致病因子複雜，包含最重要的

RTX-toxin (ApxI-ApxIV)、脂多醣、莢膜、纖毛以及外膜蛋白等，並非單一因子就能提供良好的保護效果 [4]。

由於 AP 血清型眾多，不同血清型間因無足夠之交叉免疫保護性，因此疫苗的使用需選擇當地流行之血清型。目前市面上 AP 的疫苗大多仍以傳統不活化菌苗為主。而重要毒素如 ApxI-ApxIII，為造成肺臟病變的主因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，能有效保護豬耐過 AP 的攻擊及減少肺部病變 [14]。AP 的抗原眾多，因此次單位疫苗需要多價組合，生產成本較傳統不活化疫苗高；然不含菌體之毒素次單位疫苗之研究顯示，經過三次免疫後，其肺部病變與平均日增重與對照組無明顯差別[8]，因此市面上的次單位疫苗仍是以同時添加不活化菌體為主流。因此，本計畫的目的在於改良傳統不活化疫苗，以台灣流行 1、2、5 及 7 血清型，添加重要的毒素 ApxI 以

期提高保護效果。

材料與方法

一、菌株來源：

自豬隻呼吸道疾病之病例及屠宰場肺臟檢體鈎菌於巧克力培養基，於37°C、5%CO₂環境下培養24-48小時後，挑選灰白色針點樣菌落之陰性球桿菌，以商品化鑑定套組API NH strip (bioMérieux, France) 確認其生化特性，並使用MacInnes等人[11]針對AP特有基因Apx IV的特異性引子，確認所分離之菌株為AP。隨後以實驗室自製之AP1-11型抗血清進行平板凝集試驗，同時進行聚合酶連鎖反應(PCR)，使用Gram、Sthitmatee等人[7,13]針對apx及omlA基因設計之多組引子對進行分析，確認AP分離株的血清型。

二、試製疫苗之安全試驗及效力試驗

(一)小鼠安全及效力試驗：試製疫苗組成為AP 1、2、5及7血清型各約 1×10^8 CFU/ml，添加10倍濃縮已不活化之類毒素ApxI，使用佐劑為ISA 25 (O/W)。根據國家動物用藥品檢驗標準[1]，免疫組及對照組皆為40隻小鼠，免疫兩週後，若小鼠皆健存則通過安全試驗；之後分別以血清1型、2型、5型及7型強毒株攻毒，確認各血清型之保護指數。

(二)豬隻安全試驗：以高劑量(5 dose; 2 ml/dose) 免疫豬隻(n=3)。於免疫後監測體溫及觀察注射部分皮膚，觀察兩週，若無不良反應且健存則通過安全試驗。2.3 豬隻效力試驗：實驗豬分為免疫組(n=3)及對照組(n=3)，於6-7週齡進行第一次免疫，實驗組於頸部肌肉給予試製疫苗2 ml，對照組則給予PBS 2 ml；9-10週齡進行補強注射，於12-13週齡於氣管內攻毒AP血清1型 5×10^7 CFU，以體溫、臨床症狀(呼吸次數、咳嗽、口鼻分泌物等)、活動力及食慾作為評估指標[6,9]，觀察兩週後犧牲解剖。於第一次免疫前抽血做為陰性對照，之後每週抽血做抗體檢測。

三、豬隻免疫後抗體檢測

(一)溶血抑制試驗：待測血清非動化後，先以PBS作10倍稀釋後作為起始濃度，取50 μ l以0.15M

PBS作連續兩倍稀釋，加入4HAU之ApxI充分振盪混合後，置於37°C感作30分鐘；接著加50 μ l溶於PBS之0.5%綿羊紅血球，置於37°C感作1小時，最後於4°C放置1小時後以50%溶血作為判讀終點。以此方法檢測豬隻血清中ApxI抗體。

(二)AP血清型抗體檢測：使用商品化ELISA套組ID Screen® APP Screening Indirect (IDVET innovative diagnostics, France)，可檢測抗AP菌抗體(血清1型-血清12型)，但無法區分個別血清型。另外使用分型ELISA套組Swinecheck® APP 1,9,11、Swinecheck® APP 2、Swinecheck® APP 5a,5b及Swinecheck® APP 4,7 (Biovet Inc., Canada) 檢測血清1型、2型、5型及7型抗體。其使用方法依照廠商之說明書。

四、三批疫苗試製

(一)製造三批(A, B及C)不活化菌苗，每批約1000 ml，依照國家動物用藥品檢驗標準，測試小鼠安全及效力試驗。

結果

一、菌株來源：

99年於臨床病例及現場採樣分得AP共10株，以及自種原庫分讓田間分離株27株：包含血清1型26株(26/37; 70.2%)，血清2型1株(1/37; 2.7%)，血清5型8株(8/37; 21.6%)及7型2株(2/37; 5.4%)，顯示台灣目前主要流行血清型與先前的調查結果類似[3]，因此選定AP 1、2、5及7血清型作為不活化菌苗組成。

二、試製疫苗之安全試驗及效力試驗

(一)小鼠安全及效力試驗：免疫組及對照組小鼠通過兩週的安全試驗後，以AP 1、2、5及7血清型攻毒後，其保護指數分別為1.3、1.0、1.5及1.0，符合檢定標準。

(二)豬隻安全試驗：高劑量(5 dose; 2 ml/dose) 頸部肌肉注射，將10 ml體積分兩次注射於兩側頸部肌肉。注射後3天該部位呈現發紅腫脹，於注射後10天消除。體溫於免疫後6小時體溫超過40°C，其發燒情形於免疫後48小時消失，體溫皆回復正常

(39.5±0.5°C)。於兩週的觀察期間，除皮膚紅腫外無其他明顯異常，精神、食慾皆正常。注射部位紅腫約持續7天，推測與注射部位集中於頸部，且單次注射體積過高有關，後續試驗將降低單位注射體積並分散注射部位，降低局部反應。

(三)豬隻效力試驗：實驗組免疫後6小時體溫超過40°C，其發燒情形於免疫後48小時消失，體溫皆回復正常(39.0±0.5°C)，對照組給予PBS後6小時體溫微升，但平均值39.7°C仍維持在正常範圍。兩組注射部位外觀皆正常，無明顯紅腫，攻毒前精神食慾皆正常。以血清1型 5×10^7 CFU菌量氣管攻毒後6小時，對照組豬隻呈現肢端發紺、沉鬱、張口呼吸、呼吸急促(呼吸次數超過8次/15秒)及體溫明顯下降(低於38°C)等甚急型症狀；實驗組所有豬隻體溫超過40°C，呼吸急促，行動力下降且全無食慾；攻毒後24小時內對照組全數死亡，其解剖肉眼病變可見肺臟嚴重水腫，肺葉斑狀或廣泛性出血，胸膜及肺葉表面未見纖維素生成；實驗組皆存活，其體溫、呼吸速率、活動力及食慾至攻毒後72小時恢復正常，但偶有豬隻出現咳嗽、打噴涕的臨床症狀，14天觀察期內皆無豬隻死亡。耐過的豬隻全數犧牲，肺臟呈現纖維素胸膜肺炎之病變，形成部分沾黏，舊出血病灶質硬、部分肺葉因存有膿疱結節而增厚。

(四)豬隻免疫後抗體檢測

3.1 溶血抑制試驗：此方法目的為檢測豬隻血清中ApxI抗體；對照組在實驗期間其抗體力價幾何平均皆維持在6.3倍；實驗組則是在補強免疫後1週(10週齡)明顯爬升至50.4倍，補強免疫後2週(11週齡)時達到80倍，攻毒當週(12週齡)抗體開始下降至50.4倍，攻毒耐過後1週(13週齡)升至127倍，至犧牲當週(14週齡)則高達1,280倍(圖1)。免疫產生抗ApxI抗體力價幾何平均最高達80倍，唯有攻毒耐過可使力價揚升至1,280倍。

3.2 AP血清型抗體檢測：AP血清1型-12型在LPS存有共通的結構，ID Screen® APP Screening Indirect套組可檢測AP多種血清型共通之抗體，依廠商定義S/P ratio判定陽性、疑陽性及陰性。實驗組在補強免疫後1週(10週齡)抗體陽轉率66.7%

(2/3)，於11週齡時抗體陽轉率達100%，此部分抗體的變化與溶血抑制試驗結果一致，顯示要在第二次免疫後抗體力價才明顯上升。Swinecheck® APP分型系列套組，目的在檢測血清1型、2型、5型及7型抗體。以攻毒當週(12週齡)抗體來看，針對血清1型，實驗組所有豬隻皆為陰性，抗體陽轉率為0%(0/3)；血清2型抗體陽轉率為33.3%(1/3)；血清5型抗體陽轉率為100%(3/3)；血清7型抗體陽轉率為66.7%(2/3)(圖2)。AP血清分型主要是依據脂多糖(LPS)及莢膜多糖(CPS)上的差異，即使同一血清型中，仍存有不同流行地區菌株的變異，可能是Swinecheck® APP分型ELISA抗體檢測陽轉率結果不一致的原因。

(五)三批疫苗試製

4.1 三批(A, B 及C)疫苗之小鼠安全及效力試驗：三批疫苗皆通過安全試驗，然效力試驗的部分則否；以AP 1、2、5及7血清型攻毒後，A批疫苗其保護指數分別為>1.4、1.3、1.2及1.0；B批疫苗其保護指數分別為1.2、>1.3、2.1及1.2；C批疫苗其保護指數分別為1.2、>1.5、1.5及0.8(表1)。其中C批疫苗中針對AP血清7型之保護指數僅0.8未達標準1.0，未通過效力試驗。

討論

AP分泌RTX-toxin包含ApxI-IV，ApxI具有強溶血性及細胞毒殺性，ApxII具有弱的溶血性及細胞毒殺性；ApxIII則不具溶血性，但有強細胞毒殺性[10]；ApxIV只有AP在感染活體的狀態下才會產生，目前功能仍待釐清[12]；因此試製疫苗選定重要的RTX-toxin ApxI，製成不活化的10倍濃縮類毒素，配合台灣主要流行血清型AP 1、2、5及7約 1×10^8 CFU/ml，並使用ISA 25(O/W)作為佐劑。

在動物試驗部分，小鼠安全及效力試驗皆合格；豬隻安全試驗部分，14天觀察期間豬隻皆健存，但注射部位呈現紅腫，推測與注射部位過於集中及單點注射體積過大有關，後續實驗將對此作修正。豬隻效力試驗部分，攻毒後24小時內對照組豬隻全數死亡，實驗組豬隻仍存活，其體溫、呼吸症狀、活動力

及食慾皆在攻毒後72小時恢復正常，顯示試製疫苗雖無法避免感染，其產生之抗體對高劑量強毒AP1仍具有一定程度的保護力，與Furesz等人的不活化菌苗研究結果相似[6]。

以溶血抑制試驗，配合針對AP菌共通抗體及AP分型抗體之ELISA套組檢測豬隻抗體爬升情形，結果顯示Ap₁抗體及AP菌共通抗體在補強免疫後1週（10週齡）明顯爬升；然AP分型抗體檢測結果卻不

盡相同，在攻毒（12週齡）當週抗體陽轉率為0-100%，推測同一血清型中仍存有菌株間、地域間的變異，不適合以AP分型ELISA套組作為檢測方法。三批1000 ml 試製疫苗，皆通過安全試驗，但效力試驗有一批不合格，顯示疫苗成分不夠穩定，須修正製程。

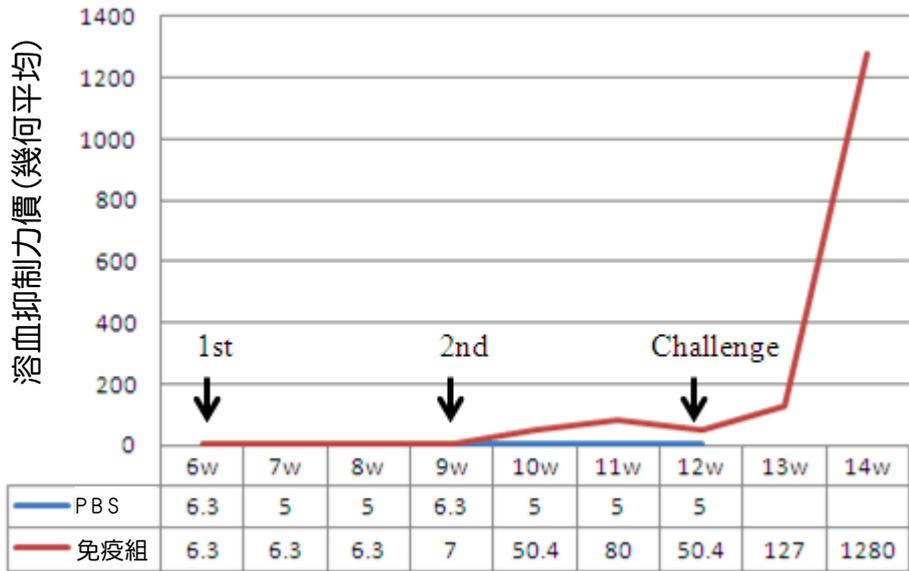


圖 1、溶血抑制試驗：免疫組（n=3）分別於 6 週齡及 10 週齡以試製疫苗免疫豬隻，對照組（n=3）則給予 PBS，兩組於 12 週齡攻毒。每週採血，以幾何平均代表該組的抗體力價。

豬胸膜肺炎放線桿菌類毒素不活化菌苗之研發

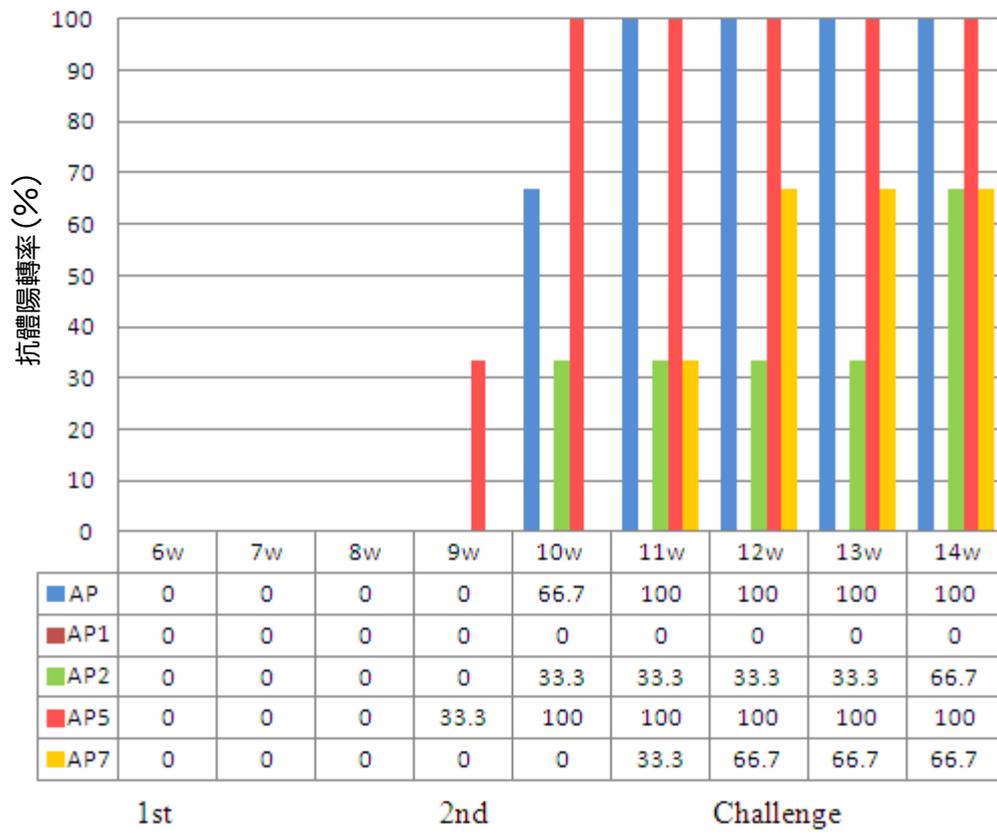


圖2、實驗組 AP 抗體陽轉率。

表1、三批疫苗之小鼠效力試驗結果。

疫苗批次	各血清型保護指數			
	AP1	AP2	AP5	AP7
A	>1.4	1.3	1.2	1.0
B	1.2	>1.3	2.1	1.2
C	1.2	>1.5	1.5	0.8

參考文獻

1. 「中華民國動物用藥品檢驗標準」(民國98年5月8日修正)第三章第五八節豬嗜血桿菌苗檢驗標準。
2. Bosse, J. T., H. Janson, B. J. Sheehan, A. J. Beddek, A. N. Rycroft, J. S. Kroll, and P. R. Langford *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect* 4:225-235. 2002.
3. Chang CN, S. Y. a. Y. P. Epidemiology of swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Bull Inst Taiwan Sugar Co*:139-147. 1990.
4. Chiers, K., T. De Waele, F. Pasmans, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* 41:65.2010.
5. Chiers, K., E. Donne, I. Van Overbeke, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol* 85:343-352. 2002.
6. Furesz, S. E., B. A. Mallard, J. T. Bosse, S. Rosendal, B. N. Wilkie, and J. I. MacInnes Antibody- and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *Infect Immun* 65:358-365. 1997.
7. Gram, T., P. Ahrens, M. Andreasen, and J. P. Nielsen An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omA* genes-evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 75:43-57. 2000.
8. Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L, Binnendijk G, Wisselink HJ, Raymakers R, Crujisen T, van der Peet-Schwering C, van Nes A and Nielen M. Efficacy of a subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. *J Swine health Prod* 16:193-199. 2008.
9. Jolie, R. A., M. H. Mulks, and B. J. Thacker Cross-protection experiments in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* subtypes 1A and 1B. *Vet Microbiol* 45:383-391. 1995.
10. Kamp, E. M., N. Stockhofe-Zurwieden, L. A. van Leengoed, and M. A. Smits Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect Immun* 65:4350-4354. 1997.
11. MacInnes, J. I., M. Gottschalk, A. G. Lone, D. S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal, S. B. Watson, and R. M. Friendship Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* 72:242-248. 2008.
12. Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers, and J. Frey Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* 145 (Pt 8):2105-2116. 1999.
13. Sthitmatee, N., T. Sirinarumit, L. Makonkewkeyoon, T. Sakpuaram, and T. Tesaprateep Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Mol Cell Probes* 17:301-305. 2003.
14. Van Overbeke, I., K. Chiers, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck 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* 48:15-20. 2001.

Investigation of Toxoid Inactivated Bacterin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*

NL Kuan, HH Tsai, CS Huang, CC Wu, C Tu

Abstract The trial inactivated bacterin was composed of 1×10^8 CFU / ml for each serotype (AP1, AP2, AP5 and AP7), 10x concentrated toxoid ApxI and adjuvant ISA 25 (O / W). The trial vaccine was passed the safety tests in mice, and the defense index (DI) for serotype 1, 2, 5 and 7 were 1.3, 1.0, 1.5 and 1.0. A high dose (5 dose; 2 ml / dose) was injected i.m.as the safety test in pigs, except the injection site swelling, no other abnormalities were observed. After challenging with 5×10^7 CFU serotype 1, the vaccinated group was survived and recovered in 72 hours, whereas the control group was died in 24 hours. The hemolysis inhibition assay and ELISA kits were used for antibody detection, the ApxI antibodies and AP antibodies were ascending after boost, however, the seroconversion rates of serotype-classified antibodies were 0-100%, suggesting that the variation existed between isolates even in the same serotype. All of three batches of the inactivated bacterin were qualified in safety tests, and one batch was disqualified from efficacy tests.

Keyword: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, toxoid, inactivated bacterin

