

臺灣哺乳豬下痢症由來*Escherichia coli*之研究 V 哺乳豬大腸菌性下痢症菌苗之免疫

陳清 久米常夫¹ 蛭間正己²
椿志郎¹ 安藤敬太郎¹ 笹原二郎¹

使用哺乳豬下痢症由來大腸菌，試製菌苗之免疫，加以檢討。懷孕母豬以腸毒素（LT、ST）及Vero cytotoxin 菌苗或線毛（K88, K99, 987P）菌苗，加以免疫，分娩後之哺乳仔豬，經口攻擊測定其感染防禦能力。另外，對於實驗豬投與菌之回收，瓊脂內沈降反應測定抗熱性腸毒素抗體，小豬腸結紮試驗測定ST防禦物質及抗線毛凝集抗體等加以探討。其結果得知，由腸毒素或線毛菌苗可使母豬獲得免疫，各自經由初乳之媒介，使其哺乳仔豬獲得被動免疫。但是由於此等兩類菌苗之交叉免疫無法獲得成立，因此實用性菌苗，必須以具產生腸毒素及線毛菌株為必要之條件。由於本症菌苗之使用，顯示母子免疫之可行性，受到相當的矚目。

緒 言

筆者等在臺灣由哺乳豬下痢症所分離之大腸菌，其藥劑抵抗力呈現多劑抵抗之傾向及傳達性R—因子（plasmid）高檢出率之情況至為明顯。在這種情形之下，如要以化學療法劑來預防及治療仔豬下痢，認為受到相當的限制。目前在一般田間對於本症之治療，頗多困難，由於多頭數飼養而經營規模日漸擴大之同時，對於菌苗之需求，至為渴望。關於大腸菌性之免疫，近年來之諸多報告，大都被認為定着因子之線毛（pili）以及下痢因子之腸毒素（Enterotoxins）為主要之檢討對象。因此在本報告中，以臺灣哺乳豬下痢症分離所得大腸菌研製菌苗之母子免疫，以及關於哺乳豬之被動免疫加以探討。

材料與方法

供試菌株及菌苗之製法：

腸毒素及Vero cytotoxin菌苗：

供試菌株：在臺灣由哺乳豬下痢症分離所得之下列三個菌株供試。

C—5株：020ab：K⁺ pili⁻：LT⁺ ST⁻ VT⁻。

C—153株：0147：K⁺ pili⁻：LT⁺ ST⁺ VT⁻。

C—112株：0⁺：K91 pili⁻：LT⁻ ST⁻ VT⁺。

培養基培養方法及菌苗之調製：使用 Evans等⁽⁹⁾（1973）之培養基，另加入0.25%之葡萄糖供用（表I）：使用此培養基，經接種後置於37°C 恆溫槽，振盪培養24小時後，將此 $3\sim 4.5 \times 10^{10}$

臺灣省家畜衛生試驗所

1. 日本北里大學獸醫畜產學部

2. 日本北里研究所附屬家畜衛生研究所

Table 1 Formula of Modified Evans Medium

Casamino Acids	20.0gm
Yeast Extract	1.5gm
NaCl	2.5gm
K ₂ HPO ₄ (0.05M)	8.71gm
Glucose	2.5gm
Trace Salt solution	1.0ml
Distilled Water	1,000ml pH 8.5
Formula of Trace Salt Solution	
MgSO ₄ 7H ₂ O	10.0gm
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.0gm
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.135gm
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.4gm
Distilled Water	1,000ml

CFU/ml之菌液，以8,000rpm遠心分離45分鐘，取其上清液再經0.45 μ m之 Millipore filter濾過之。將各菌株之等量濾液混合之。添加0.5% Formalin後，再置於37°C是溫箱24小時不活化處理，時加振盪。然後添加氫氧化鋁膠 (Aluminum hydroxide gel) 為佐劑，使其含有6—7mg/ml菌苗，即為腸毒素及Vero cytotoxin菌苗。

線毛菌苗

供試菌株：在臺灣由哺乳豬下痢症分離所得之下列二個菌株及英國 Central Veterinary Laboratory, Weybridge分讓之V50菌株供試。

C—126株：0114：K90, 99⁺：LT⁻, ST⁻, VT⁻。

C—72株：09：K60, 987p⁺：LT⁻, ST⁻, VT⁻。

V—50株 010：KV50, 88⁺, 987p⁺：LT⁻, ST⁻, VT⁻。

培養基、培養方法及菌苗之調製：參照 Guinée等¹²⁾ (1977) 及Graaf等¹¹⁾ (1980)使用之 Minca 培養基 (表2)，添加0.1% yeast extract (Difco) 及1% Iso-vitalex (BBL) 之瓊脂平板培養基供用。使用此培養基經接種後，置於37°C培養24小時後，再以PBS (-) 洗菌及集菌處理，並以滅菌紗布濾過之，調整其濃度為5×10¹⁰CFU/ml，然後添加0.5% Formalin 後，再置於37°C定溫箱中24小時不活化處理，時加振盪。經不活化處理後添加氫氧化鋁膠為佐劑，使其含量為6—7mg/ml 菌苗，即為線毛菌苗。

供試豬隻

預定分娩前一個月之懷孕母豬二頭供試，其一為 Landrace另一頭為Duroc之F1，二頭均為4胎次母豬，另以未經產及非妊娠之Landrace與Duroc F1之肥育豬 (體重70—80kg) 4頭供試。

母子免疫之方法：懷孕母豬二頭，No. 1接種腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗，No. 2接種線毛菌苗。未經產非懷孕母豬4頭之中，1及2號接種腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗，其餘二頭3及4號接種線毛菌苗。這些供試豬隻，間隔一週，分別以5、10及20ml之腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗，或線毛菌苗於耳根部肌肉注射。

Table 2 Formula of Modified Minca Medium

KH ₂ PO ₄	1.36gm
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	10.1gm
Glucose	1.0gm
Casamino Acids	1.0gm
Yeast Extract	1.0gm
Agar	12.0gm
Trace Salt Solution	1.0ml
Iso-Vitalex	1.0ml (Aseptically added)
Distilled water	1,000ml pH 7.5
Formula of Trace Salts Solution:	
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.0gm
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.0gm
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.135gm
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.4gm
Distilled water	1,000ml

分娩後對哺乳豬之攻擊試驗

腸毒素及Vero cytotoxin菌苗免疫之No. 1懷孕母豬所分娩之11頭仔豬，其中6頭使其自然哺乳，其餘5頭分娩後即與母豬隔離，使用人工乳（明治乳粉）加以人工飼育。另外，以線毛菌苗免疫之No. 2懷孕母豬所分娩之6頭仔豬，其中4頭使其自然哺乳，其餘2頭於分娩之後即與母豬隔離，與No. 1母豬所生人工飼育仔豬羣同樣的方式，以人工乳飼育。

腸毒素及Vero cytotoxin菌苗免疫之免疫豬：如表3所示之供試方式，對於由懷孕母豬No. 1所生經哺乳初乳仔豬4頭及人工飼育者3頭，以菌苗製造用3個菌株，及別的腸毒素及Vero cytotoxin產生之菌株二株（0149：K91, 88ac LT⁺ ST⁺ VT⁺及09：K91 LT⁻ ST⁺ VT⁺）分別攻擊之。攻擊菌量為3—4×10¹⁰CFU/ml之菌液5ml，加入滅菌過的人工乳10ml中，使用胃管投與攻擊之。

線毛菌苗免疫之免疫豬：懷孕母豬No. 2所生經哺乳初乳仔豬4頭中，二頭使用前述菌苗製造用菌株與前者同樣之方法攻擊之。其餘二頭及人工哺乳之二頭，則使用懷孕母豬No. 2免疫用線毛菌株3株中之987p線毛菌株來攻擊。攻擊之菌量及方法，同樣的如表3所示之區分供試。

攻擊菌之回收試驗：除斃死二頭之外，其餘11頭於攻擊後6—7日時屠殺，在主要臟器及腸管實施攻擊菌之回收試驗，所用之培養基為Macconkey瓊脂培養其（榮研），在腸管之各部位粘膜面0.5cm²以白金耳刮取，再以PBS（-）稀釋，實施定量培養試驗。檢出之攻擊菌，各各使用對應之OK抗血清及線毛血清，行凝集反應，每一平板培養基約10個菌落加以確認。

母子免疫仔豬腸管結紮攻擊試驗：No. 1懷孕母豬所生經哺乳初乳之No. 5及6號仔豬及人工哺乳之No. 10與11號二頭仔豬，參照Smith及Gyles⁽²⁴⁾（1970）所報告之方法，各使用二頭仔豬實施腸管結紮試驗。

攻擊用菌株：懷孕母豬No. 1免疫所用之菌株為：

C—5株：020ab：K ? pili⁻, LT⁺ ST⁻ VT⁻。

C—153株：0147：K ? pili⁺, LT⁺ ST⁺ VT⁻。

Table 3 Results of Protection Test for Maternal Immunity in Piglets

Sow No. vaccinated	Colostrum	Piglet No.	Challenge strains	Diarrhea											
				6 ^h	12	18	14	2	3	4	5	6	7		
1 Enterotoxins (LT,ST,VT) A		1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k		
		2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k	
	+	3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k	
		4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k	
	-	7	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k	
		8		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	k	
		9	C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k	
	2 Pili (K88, 99, 987p) B	+	12	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k	
			13		+	+	+	+	+	-	-	-	-	k	
+		14	B'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k	
		15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	k	
-		16	B'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
		17		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	k

A { C-5 (020ab : K? LT⁺)
C-153 (0147 : K? LT⁺ST⁺)
C-112 (0? : K91 VT⁺)

B' C-72 (09 : K60, 987p⁺)

B { V50 (010 : KV50, K88+987p⁺)
C-126 (0114 : K90, 99⁺)
C-72 (09 : K60, 987p⁺)

C { Abbotstown (0149 : K91, 88ac LT⁺ST⁺VT⁺)
P16 (09 : K9 ST⁺VT⁺)

C-112株：0?K91 pili⁻, LT⁻ ST⁻ VT⁺。

與母株免疫無關之菌株為：

C-54株：0112ab : K68 pili⁻, LT⁺ ST⁻ VT⁻。

New Troyer : 09 : K35 pili⁻, LT⁻ ST⁺ VT⁻。

C-31株：0128 : K67, pili⁻, LT⁻ ST⁻ VT⁺。

對照菌株：(既知腸管結紮試驗腸性菌株)

Abbotstown株：0149 : K91, 88ac H₁₀, LT⁺ ST⁺ VT⁺。

P-16株：09 : K9 pili⁻, LT⁻ ST⁻ VT⁺。

判定：結紮腸管 Loop內攻擊後20小時，如可見到香腸 Sausage 狀腫脹及滲出液增加者判定為陽性。

腸毒素及Vero cytotoxin菌苗試驗豬之LT抗毒素價

對於懷孕母豬 No. 1之經過血清(免疫前、及初次免疫後1、2、4及5週)初乳乳清，哺食初乳仔豬4頭(生後4—10日齡)及肥育豬 No. 1及2之經過血清(免疫前及免疫後1、2及4週)等之抗LT抗體價加以測定。

抗原：日本化血研分讓之 Cholera Toxin (CT)，以生理食鹽水稀釋成50—100 μ g/ml者，作為LT抗毒素測用抗原。另一方面，LT抗原，使用LT產生菌株，C—5株 (LT⁺) 及C—153株 (LT⁺、ST⁺)，依照腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗製造之方法，在Evans變法培養基，培養後經同樣方法處理後，再以 polyethylen glycol 6,000 (cica) 1/100濃縮者，供為抗原之用。

瓊脂免疫擴散試驗 (Agar gel immunodiffusion test)：以載玻片平板法，使用1% Noble agar (Difco)，孔徑0.4cm，使用PBS (-) 稀釋之血清及乳清，在瓊脂內免疫擴散試驗觀察，48—72小時判定之。對照標準血清係化血研分讓之Cholera antitoxin G5156，四倍稀釋者供用。

線毛菌苗試驗豬之抗線毛凝集價

關於懷孕母猪 No. 2之經過血清 (免疫前及免疫後5週)，初乳乳清，哺食初乳仔豬5頭血清 (其中No. 20為哺乳後1日齡屠殺，No. 12、13、14及15號為4日齡) 及未哺初乳之4頭仔豬血清 (No. 16、17、18及19號仔豬)、肥育豬二頭 (No. 3及No. 4) 之免疫前及免疫後4週之經過血清等抗線毛之凝集價加以測定。

凝集反應用抗原：使用與菌苗製造用菌體抗原羣與莢膜抗原型相異之線毛菌株，K88 (0149: K91、88ac)，K99 (0147、K89、99) 及 987p (020ab: K91、987p) 等三株，作為凝集應用抗原菌株。抗原之製備，所用之培養基，培養方法與前述線毛菌苗之調製法相同，含 5×10^{10} CFU/ml 之菌濃度，生菌為抗原液。

凝集反應方法：使用平板凝集反應方法，而被檢血清及初乳乳清，則先以倍數稀釋之後，再與前述抗原各一滴行凝集反應，如在1—2分鐘內呈現明顯凝集反應者，判定為陽性。

試驗成績

腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗或線毛菌苗之接種及仔豬之感染防禦試驗。

腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗免疫豬之試驗成績：

其詳細成績如表3所示。經哺食初乳之仔豬羣，不僅對同型 (Homologous) 菌株之攻擊有抵抗，對於異型 (Heterologous) 菌株之攻擊也能耐過，兩者之攻擊均未發生下痢症狀。相反地，以人工乳飼育之仔豬，對於異型菌株之攻擊，當然無抵抗，而同型菌株之攻擊也無法獲致防禦，均發生下痢症狀。由於這種試驗事實，證明腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗接種母猪，其初乳中具有防禦腸毒素及 Vero cytotoxin 產生菌株感染的移行抗體之存在。

而以線毛菌苗免疫母猪 No. 2所生經哺食初乳的仔豬 (No. 12及13)，以腸毒素 (LT, ST) 及 VT 產生菌株攻擊之結果，無法防禦感染而引起下痢。因此，以線毛菌苗接種免疫母猪之初乳，其移行抗體對於腸毒素 (LT, ST) 及 VT 產生株之攻擊，無法產生預防之效果。

線毛菌苗免疫豬之試驗成績：

其成績同樣如表3所示。以線毛菌苗免疫母猪 No. 2所生仔豬之中，經哺食初乳之二頭仔豬，以同型 (Homologous) 之保有987p線毛菌株攻擊之結果，雖可耐過，但是以人工乳哺育之二頭仔豬，則發生下痢，其中一頭於第6日時斃死。這種試驗成績，指出線毛菌苗之情形也同樣地在免疫母猪的初乳中，具有移行抗體的存在。但是從仔豬移行抗體的觀點來看，腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗之免疫及線毛菌苗之免疫，獲得其彼此間無交叉免疫之成績。

感染防禦試驗攻擊菌之回收：

其成績如表4所示。包括斃死仔豬2例 (No. 9及16) 在內，從全部的主要臟器及腸間膜淋巴結，對於攻擊菌之回收均為陰性。但是從斃死二例仔豬的腸管各部位，均可回收到多數攻擊投與菌。還有，從發生下痢症狀之仔豬，其小腸上部攻擊菌之回收有較多的傾向，而無下痢者其攻擊菌之回收較少。

腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗免疫豬LT抗體之產生情形：

Table 4 Recovery of challenged Strains on after Protection Test of piglets

Sow No. vaccina- ted	Colos- trum	Piglet No.	Challe- nge strains	Diarr- hea	Recovered from											
					Lung	Heart	Liver	Spleen	Kidney	Lymph node	Duodenum	Jejunum	Ileum	Cecum	Colon	Rectum
1 A	+	1	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		2		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		3	C	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		4		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	-	7	A	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		8		+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
		9	C	+	Death	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
		12	A	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
		13		+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
2 B	+	14	B'	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		15		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	-	16	B'	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		17		+	Death	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

No. of colonies

- : 0

+ : 1-10

++ : 11-100

+++ : 101~

其成績詳如表 5 所示，在以 CT 為抗原所做的瓊脂免疫擴散試驗，全例雖均為陰性成績，但以 LT 為抗原所試驗之情況，其力價雖低，却呈陽性反應。在所有免疫母豬其第五週（分娩後）之血清原液，在瓊脂免疫擴散試驗均為陽性。其次在初乳的乳清雖呈陰性反應，但是哺食初乳仔豬 4 頭，其 10 日齡的血清原液均呈陽性，雖其抗體價不高，但是經由母乳的媒介，確認仔豬血清中具有抗 LT 移行抗體的存在。至於 2 頭肥育豬，亦於基礎免疫後第 4 週之血清，確認其具有抗 LT 之抗體。

腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗母子免疫，依仔豬腸管結紮試驗產生毒素菌株之攻擊：

其成績如圖 1 所示，上段圖示 No. 5 及 6 係哺食腸毒素及 Vero cytotoxin 菌苗免疫母豬初乳之仔豬，下段 No. 10 及 11 為未哺食初乳者。在僅產生 LT 腸毒素菌株之攻擊，無論是用母豬免疫用菌株，即所謂同型（Homologous）菌株，或是異型（Heterologous）菌株攻擊之結果，在所有結紮試驗全例（4 個 Loop）均呈陰性。相反地，以產生 ST（只有 ST 或 ST 與 LT 及含 VT 者）菌株攻擊者，多數結紮 Loop 呈陽性反應。但是有哺食初乳者，其呈陽性反應者少。在以 ST 產生菌株攻擊之 8 個 Loop，僅有 3 個 Loop（37.5%）呈陽性反應。相反地，在未哺食初乳羣者 8 個 Loop 全例（100%）

Table 3 Antibody Responses against LT Enterotoxin of Sows Piglets and Fatling Pigs

Pig No.	Serum					Piglet serum		
	Weeks after vaccination					Colostrum	Days after birth	
	0	1	2	4	5			
vaccinated								
Sow No. 1	-	-	-	-	+	-	0/4	4/4※ (x1)
Fatling pig								
No. 1	-	-	-	+				
No. 2	-	-	-	+				

※Denominator showed nos. of test sera and numerator showed nos. of positivesera.

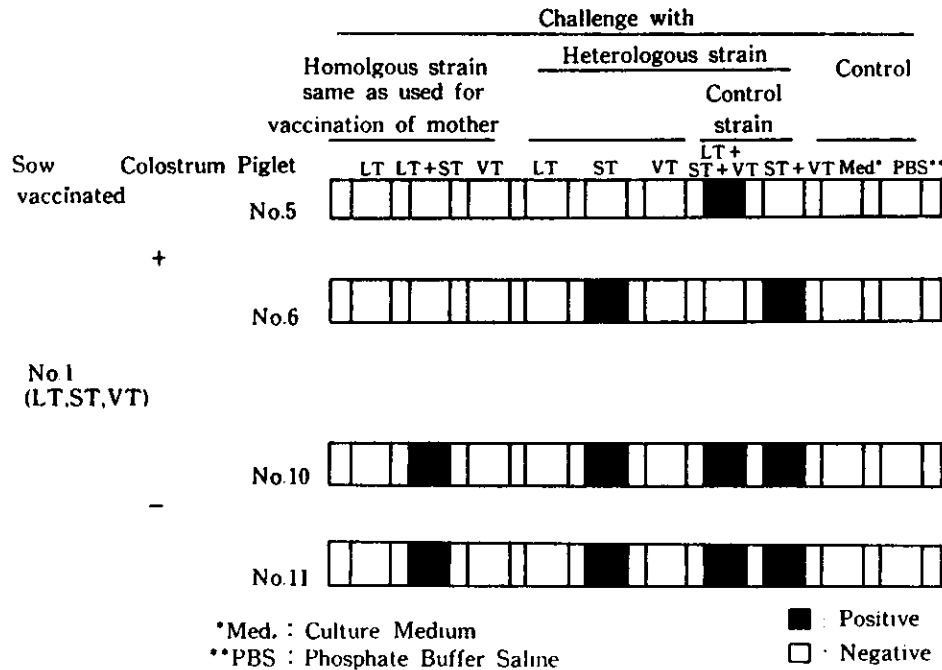


Fig. 1 Results of Loop Test with Piglets

均呈陽性反應。由此觀之，以腸毒素及 Vreo cytotoxin 菌苗免疫母猪，推測在其初乳中具有某些阻止仔猪結核反應物質，經由初乳的媒介而傳達給仔猪。

線毛菌苗免疫豬之抗線毛凝集抗體之產生成績：其成績如表 6 所示。

母猪血清之凝集價：對 K88 線毛之凝集抗體價，由免疫前的 1 : 4 上昇為 1 : 8，K99 及 987p 線毛之抗體價，由免疫前的 1 : 32 上昇到 1 : 256 及 1 : 512。

分娩後初乳血清的凝集抗體價：K88 線毛者為 1 : 16，K99 線毛者為 1 : 1,024，987p 線毛為 1 : 2,048，與血清相較，其凝集抗體價頗高。

哺乳仔猪的血清凝集抗體價：哺食初乳之一日齡仔猪，其血清中抗 K88 線毛之抗體價為 1 : 1，抗 K99 線毛之抗體價為 1 : 128，而抗 987p 線毛之抗體價為 1 : 256。哺食初乳後第 4 日 4 頭仔猪之抗體價，分別為抗 K88 線毛為 1 : 2 ~ 4，對 K99 線毛為 1 : 256，抗 987p 線毛為 1 : 512，經常呈現與

Table 6 Results of Anti-Pili Agglutination Titer of Swine

Pig used		Material	Antigen				
			K88	K99	987p		
				Agglutination titer			
Sow No. 2		Serum	0	4	32	32	
			5W.	8	256	512	
		Colostrum		16	1,024	2,048	
Piglet	20	Colostrum		1 day	1	128	256
	12				4	256	512
	13			+	2	256	512
	14				4	256	512
	15				4	256	512
	16	Serum	4 days	0	0	0	
	17			0	0	0	
	18			0	0	0	
	19			0	0	0	
Fattening pig		Serum	0	0	0	4	
			4 weeks	1	16	64	
			0	0	4	16	
			4 weeks	1	16	128	

Vaccine strains :

K88-V50 (010 : K V50, 88⁺987p⁺)
 K99-C-126 (0114 : K90, 99⁺)
 987p-C-72 (09 : K60, 987p⁺)

Agglutination test strains :

K88-Abbotstown (0149 : K91, 88ac)
 K99-C-62 (0147 : K89, 99⁺)
 987p-C-117(020ab : K91, 987p⁺)

母猪血清約略同樣成績之凝集抗體價。另一方面，在人工哺乳之仔猪，其抗體價全例均為陰性。

肥育豬之血清凝集抗體價：No. 3 猪隻對K88線毛之抗體價在免疫前無法測得，免疫後第4週為1 : 1，抗K99線毛之抗體價在免疫前亦無法測得，但免疫後第4週上昇為1 : 16，至於抗987p線毛之抗體，免疫前為1 : 4，免疫後第4週則上昇到1 : 64。No. 4 猪隻之情形與前者約略相同。對於此等三種線毛之凝集價，免疫後之成績與免疫前相較，均呈現顯著的上昇現象。由上述全例試驗成績得知，對於987p線毛抗原之凝集抗體，雖經常呈現高的凝集抗體價，但是對K88線毛抗體的上昇却較難，經常出現低的凝集抗體價，而對於K99線毛之抗體凝集價，雖較987p線毛抗體凝集價略低，但却較K88抗體價為高，適居兩者之間。

討 論

以預防大腸菌症 (Colibacillosis) 為目的之菌苗，歐洲各國早已被使用。然而在這種情況之下

之菌苗，大都是使用自家不活化菌苗，或數種檢出頻度較高血清型混合之多價不活化菌苗。因此這些菌苗之絕大部分是免疫懷孕母豬，經初乳之媒介而使哺乳仔豬獲得被動免疫抗體。Söderlind及Mölliby²⁵⁾(1980)等使用8種不同菌體抗原型福馬林(Formalin)不活化菌苗，對於產前2~3週之懷孕母豬加以免疫，使產後之哺乳仔豬經由初乳之媒介，因獲得移行抗體而能防止仔豬之下痢。以這種方法的田間試驗Cardella等²⁾(1974)亦有所報告，確認具有某些程度的有效性。另一方面，Kohler¹⁴⁾(1974)，Kohler等¹⁵⁾(1975)及Baljer等¹⁾(1980)報告以菌苗接種小豬，使其產生自家免疫之方法，亦有預防的效果。其次，還有Porter等²²⁾(1973)，Linggood及Ingram¹⁶⁾(1980)亦曾報告，以經口的方式，對小豬投與死菌液，亦能賦與產生自動免疫。Dam⁴⁾(1968)，Gay等⁹⁾(1964)認為這些菌苗係由於對菌體或荚膜抗原之抗體，與預防感染有關，在試驗上使用檢出頻率較高之血清型菌株，作為免疫用抗原，但是認為以這些菌苗來作為預防，很多常無法獲得穩定的成績。相反地，近年來毒素原性大腸菌產生之忌熱性腸毒素(Heat Labile Enterotoxin, LT)及耐熱性腸毒素(Heat Stable Enterotoxin, ST)，被認為是下痢因子而受到重視，而以此等腸毒素作為菌苗使用之有關報告，亦漸漸增多。Dobrescu及Huygelen⁵⁾(1973)，Dobrescu及Zygraich⁶⁾(1976)等以忌熱性腸毒素為菌苗，接種母豬之皮下或乳腺來免疫，Pesti及Semjen²¹⁾(1976)等報告使用LT⁺、ST⁺菌體菌苗作為母子免疫，20~30日齡之小豬再作自動免疫，認為均各有效。Schröder及Vandaele²³⁾(1980)及Dorner⁷⁾等(1980)報告以同樣的方法，使用LT菌苗的效果，亦被肯定。在這種腸毒素(Enterotoxin)中，難以使用LT菌苗者較多，但是Klipstein等¹³⁾(1981)報告，使用LT⁺、ST⁺株菌苗，可獲得強有力的免疫效果，如果使用LT⁺ST⁻株時，其產生之抗毒素或感染防禦之能力則較低。還有，自從Myers等¹⁸⁾(1973)首先以ST為菌苗之報告以來，其有關之研究報告亦漸漸增多。而有關大腸菌性仔豬下痢，在印度亦有Goel及Malik¹⁰⁾(1973)提出報告。

感染初期階段，細菌表面構造及宿主組織表面之接合受到相當的重視，尤其線毛(pili)被認為是接着因子而受到注目。其中有關毒素原性大腸菌與感染成立具有深切關係的特殊線毛之存在，至為明顯。因此，腸毒素(Enterotoxins)之產生性加上特殊的線毛(pili)，認為是本菌免疫之重要因子。以線毛保有株作為菌苗之報告者，有Morgan等¹⁷⁾(1978)使用K99及987p線毛，其有效性雖被肯定，但對異種線毛菌之感染，則無防禦能力，而在免疫學上可證明各種線毛之特異性。另一方面，Nagy等¹⁹⁾(1978)以987p線毛保有株之精製線毛菌苗，免疫懷孕母豬，經由初乳之媒介，使哺乳仔豬獲得免疫，而該等仔豬可耐過試驗攻擊。同樣的免疫方式，Nagy²⁰⁾(1980)在對小牛下痢症之試驗亦獲得確認。至其有關作用機序，未解決的問題雖然仍多，Contrepolis等³⁾(1979)認為係阻止細菌對上皮細胞之附着，以及在上皮細胞粘液層內之增殖。而Linggood及Ingram¹⁶⁾(1980)則認為係影響毒力因子信號(Code)而引起Plasmid之喪失。除了使用這些腸毒素或線毛為菌苗之外，Svendse nk及Wilson²⁶⁾(1971)，Wilson及Svendsen²⁷⁾(1971)，Kohler¹⁴⁾(1974)，Kohler等¹⁵⁾(1975)亦曾報告使用活菌苗有效，彼等係以添加0.04% Formalin使其弱毒化後，經口投與懷孕母豬來免疫，而提出有效之報告。由以上情形得知，對於哺乳豬大腸菌性下痢症菌苗之研究，約可規納為如下三類：第一、使用檢出率較高的菌體抗原型之多價菌苗，第二、使用LT或ST之腸毒素菌苗，第三、使用K88, K99或987p線毛菌苗。因此筆者等乃以腸毒素及線毛菌苗之有效性作為母子免疫，而加以試用檢討與確認。其結果得知，無論是腸毒素菌苗或者是線毛菌苗之試驗成績與多數研究者之報告同樣地其母子免疫是可能的，確認其對哺乳仔豬之下痢，具有預防之效果。但是這兩種菌苗之交叉免疫無法成立，這一試驗成績，却未曾在其他報告中見到。因此，使用可產生LT及ST腸毒素且具有K88, K99及987p線毛等保有菌株，而開發有效菌苗之可能性是指日可待。筆者等在本試驗報告中，對於以異種線毛保有株攻擊之感染防禦試驗，對LT及ST抗毒素力價或抗線毛抗體等有關測定法之討論，尚待檢討。至於腸毒素菌苗，雖混以Vero cytotoxin，但其有效性却未能加以探討。然而，由於本症菌苗可引起之母子免疫，確認其可能性，今後重複的試驗，以及田間應用之可行性，擬進一步的加以

探討。另外，Vero cytotoxin之毒性，亦是需加解明之問題，期待今後之研究，能有更大的進展。

誌 謝

本研究及所提之系列報告，承蒙日本北里研究所附屬家畜衛生研究所之諸多協助，臺灣省政府經費之資助，得以順利完成學業，謹併誌萬分的感謝。

參考文獻

- 1) Baljer, G.: Stimulation of an early protection after oral vaccination with inactivated *E. coli* organisms. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, Denmark. 162 (1980).
- 2) Cardella, M. A., Huhn, R. C. & Wilson, M. R.: Immunity to neonatal colibacillosis: Field studies. J. Am. Vet. Med. Assoc., 164, 299—303 (1974).
- 3) Contrepoint, M., Dubourguier, H. C., Bordas, C. & Gouet, P.: *E. coli* K99⁺TS⁺ et diarrhée du veau. Rec. Méd. Vét., 155, 553—558 (1979).
- 4) Dam, A.: Studies on the gammaglobulin levels in sera of calves from herds with colisepticaemia as a problem, and some investigations on the content of specific antibodies in colostrum. Nord. Vet. Med., 20, 499—457 (1968).
- 5) Dobrescu, L. & Huygelen, C.: Immunological studies in laboratory animals with enterotoxins from enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. Zentralbl. Veterinaarmed., B, 20, 222—229 (1973).
- 6) Dobrescu, L. & Zygraich, N.: Prevention of porcine neonatal scours related to *E. coli* enterotoxins. Proc. Pig Vet. Soc. Cong., Iowa, USA. J 6 (1976).
- 7) Dorner, F., Mayer, P. & Leskova, R.: Immunity to *Escherichia coli* in piglets: The role of colostrum antibodies directed against heat labile enterotoxin in experimental neonatal diarrhoea. Zentralbl. Veterinaarmed., B, 27, 207—221 (1980).
- 8) Evans, D. G., Evans, Jr. D. J. & Pierce, N. F.: Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 7, 873—880 (1973).
- 9) Gay, C. C., McKay, K. A. & Barnum, D. A.: Studies on colibacillosis of calves. II. A clinical evaluation of the efficiency of vaccination of the dam as a means of preventing colibacillosis of the calf. Can. Vet. J., 5, 297—308 (1964).
- 10) Goel, Y. P. & Malik, B. S.: Isolation of *Escherichia coli* associated with diarrhoea cases of piglets. Indian J. Anim. Sci., 43, 434—438 (1973).
- 11) Graaf, F. K., Wientjes, F. B. & Boor, P. K.: Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups 08, 09, 020 and 0101 grown at different conditions. Infect. Immun., 27, 216—221 (1980).
- 12) Guinee, P. A. M., Veldkamp, J. & Jansen, W. H.: Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 15, 676—678 (1977).
- 13) Klipstein, F. A., Engert, R. F. & Clements, J. D.: Immunization of rats with heat labile enterotoxin provides uniform protection against heterologous serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 32, 1100—1104 (1981).
- 14) Kohler, E. M.: Protection of pigs against neonatal enteric colibacillosis with colostrum and milk from orally vaccinated sows. Am. J. Vet. Res., 35, 331—338 (1974).

- 15) Kohler, E. M., Cross, R. F. & Bohl, E. H.: Protection against neonatal enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 757—764 (1975).
- 16) Linggood, M. A. & Ingram, P. L.: The effect of immunisation with heat stable *E. coli* antigens on the sensitivity of pigs to enterotoxins. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, Denmark*. 157 (1980).
- 17) Morgan, R. L., Isaacson, R. E., Moon, H. W., Brinton, C. C. & To, C. C.: Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili: Protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect. Immun.*, **22**, 771—777 (1978).
- 18) Myers, L. L., Newman, F. S., Wilson, R. A. & Catlin, J. E.: Passive immunization of calves against experimentally induced enteric colibacillosis by vaccination of dams. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 29—33 (1973).
- 19) Nagy, B., Moon, H. W., Isaacson, R. E., To, C. C. & Brinton, C. C.: Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.*, **21**, 269—274 (1978).
- 20) Nagy, B.: Vaccination of cows with a K99 extract to protection newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infect. Immun.*, **27**, 21—24 (1980).
- 21) Pesti, L. & Semjén, G.: Control of disease caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Hungary. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1976 Cong., Iowa, USA*. J 5 (1976).
- 22) Porter, P., Kenworthy, R., Holme, D. W. & Horsfield, S.: *Escherichia coli* antigens as dietary additives for oral immunisation of pigs: Trials with pig creep feeds. *Vet. Rec.*, **92**, 630—636 (1973).
- 23) Schröder, W. & Vandaele, W.: Efficacy of Ecopig at an intensive breeding farm with *E. coli* problems. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, Denmark*. 156 (1980).
- 24) Smith, H. W. & Gyles, C. L.: The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Med. Microbiol.*, **3**, 387—401 (1970).
- 25) Söderlind, O. & Möllby, R.: Virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from a field material of piglets with diarrhoea from vaccinated and unvaccinated sows. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, Denmark*. 145 (1980).
- 26) Svendsen, J. & Wilson, M. R.: Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Effect of feeding colostrum or serum from vaccinated sows to *Escherichia coli* infected gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 899—904 (1971).
- 27) Wilson, M. R. & Svendsen, J.: Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Serologic response of sows given formalin-treated live *Escherichia coli* vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, **32**, 891—898 (1971).

Studies on *Escherichia coli* Originated from Diarrhea of Suckling Piglets in Taiwan

V. Vaccine immunity of the *Escherichia coli* from suckling piglets with diarrhea.

Ching CHEN, Tsuneo KUME¹, Masami HIRUMA², Shiro TSUBAKI¹
Keitaro ANDO¹ and Jiro SASAHARA¹

Escherichia coli, isolated from the suckling piglets with diarrhea, were used for vaccine production. The immunity is discussed as follows: The pregnant sows were immunized with the enterotoxins (LT, ST) and vero cytotoxin vaccine or the pili(K88, K99, 987p) vaccine. After farrowing, the suckling piglets were orally challenged with bacterial suspension to detect their protection ability. Besides, several tests were performed: agar gel immunodiffusion tests, to detect anti-LT antibody; piglet loop tests, to detect ST defense materials; and slide agglutination tests, to detect anti-pili antibodies. The results of the experiment indicated that the sows acquired immunity from the enterotoxins or the pili vaccine, and their suckling piglets obtained passive immunity via the colostrum. However, the cross immunization could not be obtained in these two types of vaccines. In practical application, it is essential for vaccines to be able to produce enterotoxins and pili strains. By virtue of the application of vaccines, the immunization on both sows and their suckling piglets was considered to be possible and was highly thought of.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

1. School of Veterinary Medicine and Animal Science, Kitasato University. JAPAN

2. Research Center for Veterinary Science, The Kitasato Institute. JAPAN