

# 豬大腸桿菌線毛腸毒素菌苗之 免疫性與田間應用試驗

陳清 呂清泉 林再春<sup>1</sup> 謝快樂<sup>2</sup>  
黎南榮 詹益波 張天桂 林旭志  
洪典戊<sup>3</sup> 梁振賢<sup>3</sup> 張文章<sup>4</sup>

以具線毛 ( Pili ) 與產生腸毒素 ( Enterotoxins ) 之大腸桿菌菌株，供為免疫用菌苗製造株，將製成之菌苗接種於 56 頭懷孕母豬，2 頭在試驗室，54 頭在田間 2 個農場，均無不良之接種反應，且產生堅固之免疫效果。懷孕母豬免疫後，其血清或初乳血清以凝集反應試驗結果，得知抗 K88、K99 及 987 P 線毛之抗體價，分別由 0 倍或低倍上昇到 32 倍 ~ 2,048 倍不等，並以瓊脂免疫擴散試驗 ( Agar gel immunodiffusion test ) 結果，得知抗忌熱性腸毒素 ( Anti-heat labile enterotoxin ) 之抗體值，血清中達 4 倍，乳清中達 32 倍。仔豬由免疫母豬初乳所得抗 K88、K99 及 987 P 線毛之抗體質，近似於母豬血清之抗體質。而抗忌熱性腸毒素之平均抗體質，在試驗室免疫母豬 No. 1 及 2 所生之仔豬分別為 3.6 倍及 6 倍，在田間應用試驗 A 農場免疫母豬所生仔豬血清之平均抗體質為 6.4 倍，B 農場者 7.1 倍。

試驗室免疫母豬所生仔豬，以  $5 \times 10^{10}$  CFU/ml 之含腸毒素及線毛菌液 10 ml 經由胃管攻擊試驗，其堅固之免疫效果獲得證實。另一方面，以小白鼠 20 隻腹腔注射菌苗免疫後，再以  $8-9 \times 10^8$  CFU/ml 之含腸毒素與線毛之菌液 0.1 ml 腹腔攻擊之結果，免疫組之活存耐過率為 100% ( 20/20 )，對照組活

存率為 0% ( 0/10 )。

早發性大腸菌性下痢症 ( Neonatal enteric colibacillosis ) 為仔豬最重要疾病之一。由於世界各國學者專家之積極研究，對於本病原性狀之探討，發病機序之研究，有效菌苗之開發及仔豬飼養管理，衛生環境與保溫設備等均有長足之進展<sup>(1,2,3,6,7,9,10,12,13,15)</sup>。而使用菌苗免疫懷孕母豬，分娩後經由初乳之媒介，以保護初生仔豬，咸認為是最經濟有效與可行之方法。在菌苗開發方面，雖有試行多價不活化菌苗<sup>(4,11,25)</sup>，多價弱毒活化菌苗<sup>(5,26)</sup>，腸毒素菌苗<sup>(14,24)</sup>、線毛菌苗<sup>(20,21,22)</sup>及以霍亂類毒素等作為免疫用抗原等。然而在臺灣由仔豬大腸桿菌性下痢症分離所得病原深入研究之結果，證實有產生腸毒素及線毛菌株之存在<sup>(6)</sup>，且以此二類菌株分別試製不活化菌苗作免疫試驗之結果，兩者之交叉免疫無法成立，故免疫用抗原以同時含有腸毒素及線毛為必要之條件<sup>(6)</sup>。本試驗即在探討此等抗原試製菌苗之免疫性，田間應用及抗體產生之情形。

## 材料及方法

### 試驗材料

1. 供試菌株—大腸桿菌 O 149 ; K91、88

臺灣省家畜衛生試驗所。

1. 行政院農業發展委員會。

2. 國立中興大學獸醫學系。

3. 臺灣省畜產試驗所苗栗種畜繁殖場。

4. 嘉義縣家畜疾病防治所。

轉載自中華民國農學團體 72 年度聯合年會特刊，19—28 頁。

LT<sup>+</sup>ST<sup>+</sup>, O 147 : K ? ST<sup>+</sup>, O 114 : K 90、99<sup>+</sup>, O 89 : K ? 987 P<sup>+</sup> 等 4 株, 腸毒素菌株經 Y-1 細胞或乳鼠與家兔腸結紮試驗證實, 線毛菌株則經血清反應及電子顯微鏡觀察確認者如圖 1 之例。

2. 培養基—Tryptic soy agar, Tryptic soy broth (Difco) Modified Minca Media, Modified Evans Media 等<sup>(8)</sup>。

3. 抗體測定用抗原—線毛抗原 K 88、K 99、987 P 與熱性腸毒素抗原均依筆者(陳)<sup>(8)</sup>報告之方法在本研究室製備供試。

4. 線毛抗血清—為日本東芝化學製藥公司產製, 由北里大學教授久米常夫博士轉致提供。

5. 供試動物—小白鼠為 13—15 公克健康佳良經觀察 72 小時後供試, 試驗室所用懷孕母豬係向省畜產試驗所苗栗種畜繁殖場購入之產前一個月母豬。田間應用試驗供試之懷孕母豬, 一為苗栗種畜繁殖場, 另一為嘉義縣民雄鄉邱農場等所提供。

## 試驗方法

### 1. 菌苗之製造

供試之腸毒素及線毛菌株, 分別於 Tryptic soy broth 在 37°C 下預備培養 18—20 小時, 然後移植於大量製造用之培養基, 分別以振盪培養法及靜置培養法培養 20—24 小時, 將收集所得之菌液調整濃度, 再以 0.5% 福馬林 (Formalin) 不活化處理及添加 0.02% 馬祖寧 (Merzonin, Thiomersal) 為防腐劑, 並以氫氧化鋁膠 (Aluminum hydroxide gel) 為佐劑, 使研製所成菌苗中含有  $2-2.2 \times 10^{10}$  CFU/ml 及 6—7 mg/ml 鋁膠之不活化菌苗。

### 2. 效力試驗

a 對懷孕母豬之免疫法: 產前 4—5 週之母豬先行採血, 供抗體測定, 然後肌肉注射本菌苗 5 ml, 兩週後補強注射 10 ml, 懷孕母豬於初次菌苗接種後 2 週 (試驗室部份) 及 4 週採血, 並於分娩時採初乳 (試驗室部份) 供為抗體測定之用, 田間應用試驗母豬則僅於菌苗接種前及分娩後, 部份抽樣採血供試。而所生仔豬無論是試驗室部份 (全部仔豬) 或田間應用部份 (每胎抽樣 1—2 頭

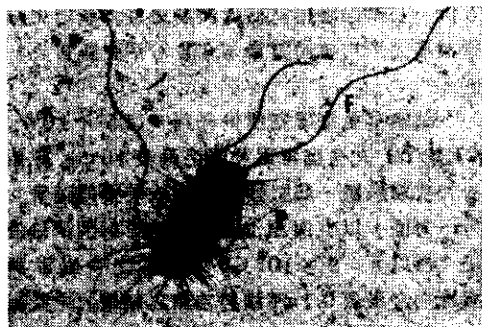
) 均於 3—4 日齡時採血, 供為抗體測定之用。

b 對小白鼠之免疫試驗: 研製之菌苗以 PBS<sup>(9)</sup> 10 倍稀釋後腹腔免疫注射 20 隻, 每隻 0.5 ml, 3 週後再以腸毒素及線毛菌株之肉羹 24 小時培養之混合菌液 0.1 ml 腹腔內注射攻擊, 觀察 5 日, 每日詳細記錄斃死隻數, 同時以未接種菌苗小白鼠 10 隻作為對照試驗。

c 對仔豬之保護試驗: 試驗室免疫母豬所生之仔豬於 4 日齡時, 以腸毒素及線毛菌株 24 小時分別培養之混合菌液  $10 \text{ ml} (5 \times 10^{10} \text{ CFU/ml})$  以胃管投與方式口服攻擊之, 觀察 7 日, 每日詳細觀察並記錄有無下痢及其他情況。

### 3. 免疫抗體之測定法

試驗室免疫母豬之血清, 初乳血清及仔豬之血清, 田間應用試驗母豬血清, 仔豬血清, 經遠心分離所得之材料於 56°C 30 分鐘非酶化處理後供試。抗 K 88、K 99 及 987 P 線毛抗體, 分別以急速凝集反應試驗測定之。抗熱性腸毒素抗體則以瓊脂免疫擴散試驗法 (Agar gel immunodiffusion test) 測定之, 24—72 小時判定。



圖一、大腸桿菌線毛血清反應陽性菌株之電子顯微鏡所見例 (12,000 倍, F: 鞭毛, P: 線毛)

Fig 1: Serological positive *E. coli* strain with pili under E. M. 12,000× (F: Flagella, P: Pilus)

## 結 果

### 1. 免疫豬抗線毛抗體之產生情形

在試驗室對二頭懷孕母豬( No. 1 及 2 ) 於免疫前及免疫後 2 週、4 週( 即補強注射後 2 週 ) 採得之血清及分娩時，採取之初乳，經測定其抗線毛 K 88、K 99 及 987 P 抗體價之結果，得知母豬免疫前抗三種線毛之抗體價，雖可測出，但力價低，而免疫後其力價呈顯著上昇，且初乳之抗體價近似或略高於母豬血清之抗體價。而仔豬血清之平均抗體價也與母豬血清之抗體價相近，詳如表一。

田間應用試驗之二農場，A 場免疫注射 33 頭懷孕母豬，採取血液樣本 9 頭，B 場免疫注射 21 頭懷孕母豬，採取血液樣本 10 頭，此二農場採得之血液樣本，經抗體測定之結果，免疫注射前抗線毛抗體價均低，即免疫後其抗體價均呈顯著之上昇，與試驗室試驗部份相類似。分娩後仔豬於 3—4 日齡時，A 場每胎採血 2 頭，共採 18 頭仔豬血清樣本，B 場每胎採血 1—2 頭，共採 15 頭仔豬血清樣本，經抗體測定之結果，證實獲得與母豬血清力價相近之被動性免疫抗體，詳如表二。

表一 試驗室免疫母豬及其仔豬抗線毛抗體之檢出成績  
Table 1: Results of Pili Antibodies Detection from Vaccinated Sows and Their Piglets in Laboratory

母豬號碼 Sow No.	抗體種類 Kind of antibody	母 豬 血 清 力 價 Serum titer of sows		初乳力價 Colostrum titer	平均仔豬 血清力價 Average titer of piglets serum	範 圍 Range
		預防接種前 Before vaccination	接 種 後 After vaccination			
		1	K 88			
	K 99	4	128	128	102	( 32—128 )
	987 P	4	128	256	147	( 32—256 )
2	K 88	4	512	512	137	( 64—256 )**
	K 99	64	512	512	512	( 512 )
	987 P	128	1,024	4,096	1,536	( 512—2,048 )

備 註：平均力價係 9 頭仔豬數學平均之逆數值。

Remarks: \*Average titer of 9 piglets by arithmetic means of reciprocals.

平均力價係 6 頭仔豬之平均值，算法同上。

\*\*Average titer of 6 piglets calculated the same as above.

表二 田間應用免疫母豬及其仔豬抗線毛抗體之檢出成績  
 Table 2: Results of Pili Antibodies Detection from Vaccinated  
 Sows and Their Piglets in Field Application

農場	接 種 採 樣		抗體種類 Kind of antibody	母 豬 血 清 抗 體 質 Serum titer of sows		仔豬平均 血清力價 Average titer of piglets serum	範 圍 Range
	母 豬 數	母 豬 數		菌 苗 接 種 前 Before	菌 苗 接 種 後 After		
	No. of sows vaccin- ated	No. of sows sampling					
A	33	9	K 88	4(0-16)	135(32-256)	109	(32-256)*
			K 99	27(2-64)	299(128-512)	149	(64-256)
			987 P	49(4-128)	555(128-1,024)	274	(64-512)
B	21	10	K 88	4(2-8)	121(32-256)	74	(32-128)**
			K 99	18(8-64)	150(32-512)	91	(32-256)
			987 P	103(16-256)	954(64-2,048)	435	(32-1,024)

備 註：每胎二頭仔豬共 18 頭之數學平均逆數值

Remarks: \*An arithmetic means of reciprocals of 18 piglets tested from 2 piglets each litter.

每胎 1—2 頭共 15 頭之試驗成績

\*\*A total of 15 piglets tested from 1—2 piglets each litter.

## 2. 抗忌熱性腸毒素抗體之產生情形

在試驗室二頭懷孕母豬於免疫前均未能檢出抗體之存在，而於免疫後 2 週及補強注射後 2 週採血，並於分娩時採得之初乳，經測定抗體之結果，免疫後 2 週之抗體價均為 4 倍，而補強注射後 2 週之抗體價分別為 4 倍、8 倍，初乳之抗體價二頭均為  $\geq 32$  倍。而所分娩仔豬 4 日齡時之平均抗體價，No. 1 母豬所生者為 3.6 倍，No. 2 母豬所生者為 6 倍，此等成績與各該母豬免疫後 4 週（亦即補強注射後 2 週）之血清中抗體價頗為相當（No. 1 母豬為 4 倍，No. 2 母豬為 8 倍），詳如表三及圖二之 A 與 B。

田間應用試驗，A 農場之 33 頭母豬中採取之 9 頭血清樣本及 B 農場之 21 頭母豬中所採取之 10 頭血清樣本，免疫前亦均未能測出抗體之存在，免疫後血清樣本之平均抗體價，A 場為 3.3 倍、B 場為 4 倍。而 A 場 18 頭，B 場 15 頭之仔豬血清樣本，其平均抗體價分別為 6.4 倍及 7.1 倍，此二場之抗體價頗為接近，可見製成菌苗之穩定性，詳如表四。又在 A 場田間應用試驗時，發現免疫後母豬血清抗體價雖僅有 4 倍之試驗例，而其所生產仔豬採樣 2 頭血清之抗體價，均  $\geq 32$  倍，如圖三所示。

表 3 試驗室免疫母豬及其仔豬抗忌熱性腸毒素抗體之免疫反應  
 Table 3: Immune Responses of Sows and Their Piglets Against  
 LT Enterotoxin in Laboratory

母豬號碼 Sow No.	母豬血清力價 Serum titer of sows			初乳力價 Colostrum titer	供試仔豬數 No. of piglets tested	仔豬平均 血清力價 Average titer of piglets serum	範圍 Range
	週 (WK)						
	0	2	4				
1	< 1	4	4	≥ 32	9	3.6	(2-8)
2	< 1	4	8	≥ 32	6	6	(2-8)

備註：應用免疫擴散試驗法測出抗體價及依數學平均之逆數值

Remark: Antibody titers were detected with agar gel immunodiffusion test and averaged by arithmetic means of reciprocals.

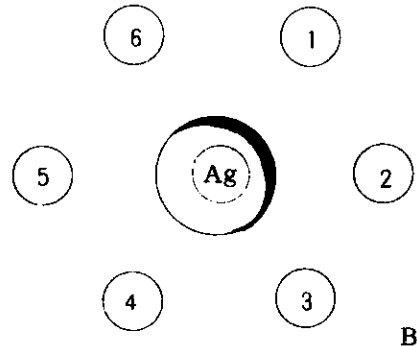


圖 二 應用免疫擴散試驗測定免疫母豬初乳抗忌熱性腸毒素抗體

Fig 2: Immunodiffusion test of anti-LT antibodies in the colostrum of vaccinated sow.

The center well contained LT antigen.

Well 1: Contained undiluted colostrual whey.

Well 2, 3, 4, 5, and 6 were contained 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 diluted colostrual whey, respectively.

表四 田間應用免疫母豬及其仔豬抗忌熱性腸毒素抗體之免疫反應  
 Table 4 : Immune Responses of Sows and Their Piglets  
 Against LT Enterotoxin in Field Application

農場 Farm	接 種 母 豬 數 No. of sows vaccin- ated	採 樣 母 豬 數 No. of sows sampling	母豬血清平均抗體價 Average titer of sows Serum		採 樣 仔 豬 數 No. of piglets tested	仔 豬 血 清 平均抗體價 Average titer of piglets serum	範 圍 Range
			菌苗接種前 Before vaccination	菌苗接種後 After vaccination			
			A	33			
B	21	10	< 1	4(2-8)	15	7.1	(2-32)

備 註：應用免疫擴散試驗法測出抗體價及依數學平均之逆數值。

Remark : Antibody titers were detected with agar gel immunodiffusion test and averaged by arithmetic means of reciprocals.

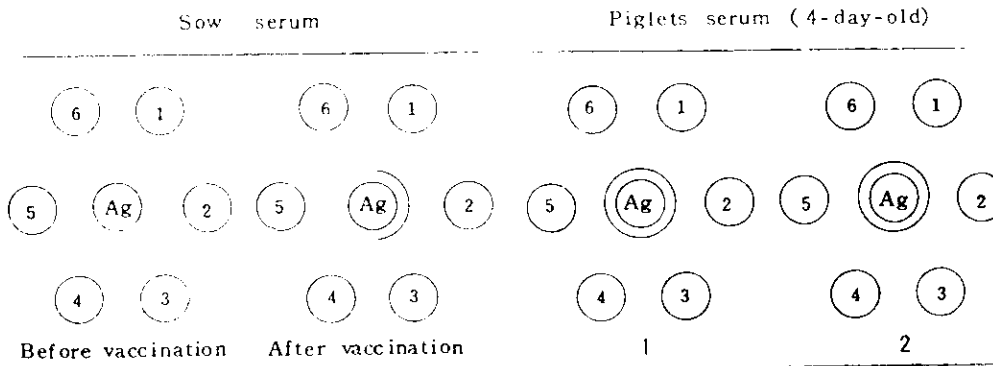


圖 三：田間應用免疫母豬及其仔豬血中抗忌熱性腸毒素抗體免疫擴散反應之一例。

Fig 3 : Immune responses of sow and their piglets against LT enterotoxin by immunodiffusion test.

(An example in field application)

The center well contained LT antigen.

Well 1 : Contained undiluted serum.

Well 2, 3, 4, 5, and 6 were contained 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 and 1 : 32 diluted serum, respectively.

3. 小白鼠免疫效力及菌苗保存性試驗成績：  
 研製之不活化菌苗，經免疫注射於小白鼠後 3 週，再以腸毒素及線毛菌株培養之混合菌液腹腔攻擊結果，獲得良好之免疫效果，試驗群之活存耐過率為 100% (20/20)，而對照

群則全部於 24 小時內斃死。又冷藏於 4°C 冰箱內 6 及九個月，取出試驗之結果，尚能保持很高之力質，可見本菌苗至少可保存於 4°C 冰箱內 9 個月，而不影響其免疫效果，詳如表五。

表五 大腸桿菌菌苗對於小白鼠之免疫及保存性試驗  
 Table 5 : Results of potency and preservation tests  
 on E. coli vaccine in mice.

		使用之菌苗及攻擊後小白鼠之活存數 Vaccine used & Survival of mice after challenge		
群 別 Group	菌苗製成直後 Immediately after preparation (%)	4°C 冷存 6 個月 Preservated in refrigerator (4°C) for 6 months	4°C 冷存 9 個月 Preservated in refrigerator (4°C) for 9 months	
	試 驗 群 Experimental	20/20 (100)	19/20 (95)	18/20 (90)
對 照 群 Control	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	

備 註：活存數/供試數

Remarks: No. of mice survival/No. of mice tested.

1. 每隻小白鼠腹腔注射 10 倍稀釋液 0.5 ml。

Each mouse Was vaccinated with 0.5 ml 10 diluted vaccine, IP.

2. 預防接種三週後每隻小白鼠以含腸毒素及線毛之混合菌液 0.1 ml 腹腔注射攻擊之。

Three weeks after vaccination, the mice were challenged with 0.1 ml bacterial suspension ( $8-9 \times 10^8$  CFU/ml) containing enterotoxins and pili, IP.

4. 仔豬被動免疫效果攻擊試驗成績：

試驗室供試母豬所生之仔豬，於 4 日齡時採血供抗線毛及抗忌熱性腸毒素抗體測定後，以胃管投藥注入腸毒素及線毛菌株之培養混合菌液 10 ml，觀察 7 日所得之結果，除

No. 1 母豬所生仔豬 9 頭中有 2 頭發生輕度下痢，而於 2 日內自行恢復外，其餘試驗豬均無任何不良之反應，而對照仔豬 8 頭中有 6 頭發生下痢，其中 2 頭下痢後於第二天恢復，其餘 4 頭因脫水虛弱而斃死，詳如表六。

表六 試驗室免疫母豬所生仔豬對於經口攻擊之保護試驗

Table 6 : Results of Protection test Against Exposure Challenge of Piglets from Vaccinated sows in Laboratory

群別	試驗仔豬數 No. of piglets tested	發生下痢仔豬數 No. of piglets occurring diarrhea	仔豬死亡數 No. of piglets died
Sow No. 1	9	2	0
Sow No. 2	6	0	0
對照 Control	8	6	4

備註：以腸毒素及線毛混合菌液 10 ml 經胃管口服攻擊之。

Remark : Challenge with 10 ml ( $5 \times 10^{10}$  CFU/ml) bacterial suspensin mixed with enterotoxins and pili by stomach tube.

## 討 論

仔豬下痢之病因有細菌性、病毒性及原蟲類等，其中以大腸桿菌性下痢所佔比例為最高<sup>(27)</sup>。以往對於大腸菌性下痢症之預防，以多價血清型之不活化菌苗或弱毒化菌苗為主<sup>(18,19)</sup>，對於防治本病頗有所助益。近年來由於腸毒素 (Enterotoxins, LT 及 ST) 下痢機轉之解明，及其檢出法之開發<sup>(13,15,23)</sup>，以及定着因子 (Colonization factor, K 88, K 99 及 987 P) 對於仔豬下痢所扮演之角色，及試製菌苗免疫效果之證實，而對於本病之防治有更深入之瞭解<sup>(20,21,22)</sup>，因此在防治工作上亦有所改進。而 Dobrescu 及 Huggelen<sup>(14)</sup>，Pesti 及 Semzen<sup>(24)</sup> 等則以腸毒素作為免疫之抗原。筆者 (陳)<sup>(8)</sup> 曾以腸毒素 (LT 及 ST) 以及 Vero cytotoxin 試製不活化菌苗及線毛 (K 88、K 99 及 987 P) 菌苗，分別免疫懷孕母豬及中豬，其產生之抗體，可由血清中測出，且經由初乳之媒介可證明出仔豬血清中有被動性免疫抗體之存在，而確定母子免疫之可行性與實用價值，更由攻擊試驗中得知其保護效果。然而由於二類抗原交叉免疫無法成立，因此有效完整之菌苗，應包括腸毒素抗原及線毛抗原，才能有效防遏田間腸毒素菌株及線毛菌株單獨

，或混合之感染，以確保仔豬免受危害。在本試驗中所試製之菌苗，具有腸毒素及線毛二大類抗原因子，因此無論是試驗室免疫之母豬或田間應用試驗母豬，其血清中或初乳中，對於線毛或腸毒素抗體之產生，均能分別加以測出且抗體價甚高，同時經哺乳之仔豬，其血清中抗線毛或抗腸毒素之抗體亦可檢出，且具有與母豬血清相近似或略高之抗體價，已詳如前述試驗結果之成績。

在試驗室部份，仔豬於 4 日齡採血後，以腸毒素及線毛菌株培養之混合菌液，經胃管攻擊之結果，免疫試驗群均能抵抗攻擊而免於斃死，而對照群則有 50% 之死亡率。至於使用小白鼠作為免疫效力試驗，Gregory 及 Cardella<sup>(17)</sup> 曾以小白鼠之懷孕母鼠為模式試驗，可證明出被動性免疫效果，然而筆者仿試之結果，認為試驗進行上頗為不便，且出生後仔鼠屢有被母鼠吃掉之情形，而改為皮下免疫注射法及菌苗稀釋後腹腔注射法免疫，發覺以腹腔免疫法較為穩定且可靠。在本試驗中菌苗製成後，對於小白鼠之免疫效力達 100% (20/20)，4°C 冰箱冷藏 6 個月及 9 個月其免疫效力仍很高，已如前述。又在本試驗中免疫抗體測定之結果，無論是試驗室部份或田間應用部份，所得成績均頗為一致。得知菌苗之穩定性及



其製造過程上已建立相當之信心，更由保存性試驗結果得知，至少可在冷室保存9個月，因此具有實用價值。且抗忌熱性腸毒素抗體價較筆者（陳）<sup>(6)</sup>之試驗成績為高，誠為可喜之現象。至於耐熱性腸毒素之抗體測定及其重要性雖不如忌熱性腸毒素來得重要，今後仍待繼續加以探討。由於本項線毛腸毒素菌苗之開發及應用試驗結果，證實其有效性與實用價值，因此擬大量生產，供應全省養豬業（種豬場）之應用，以被動性免疫法預防哺乳仔豬早發性大腸菌性下痢症，藉以提高農民養豬收益。

## 誌 謝

本研究之完成，承行政院農業發展委員會72農建—4.1—一產—68<sup>(3)</sup>經費之補助，日本北里大學教授久未常夫博士之指導，謹致深謝。又本報告初稿完成時蒙臺糖公司畜產研究所研究員張靖男博士之斧正併誌萬分謝忱。

## 參 考 文 獻

1. 張照夫、蘇金田、董明澄（1974）：本省仔豬下痢症之研究，I 分離之大腸菌血清型及其藥劑感受性試驗，屏東農專畜牧獸醫學會會報，11卷2期21—27。
2. 張照夫（1982）：仔豬大腸桿菌症之病原菌血清型，臺灣畜牧獸醫學會會報，40，1—5。
3. 林進入、郭登志、貝仁興、許正成、蔡德斌（1976）：臺灣南部地區引起豬大腸菌症菌型之調查，臺灣省畜牧獸醫學會會報，28，15—22。
4. 林進入、郭登志、貝仁興（1976）：豬大腸菌症菌苗的開發研究，臺灣省畜牧獸醫學會會報，28，23—29。
5. 嚴家清、翁仲男、王貞富、沈詠梅（1976）：大腸桿菌福馬林化活菌苗免疫效力之研究，臺糖公司畜產研究所64—65年期研究報告，155—163。
6. 嚴家清、張靖男、沈詠梅、王貞富、劉堂輝、羅麗華（1978）：仔豬病原性大腸菌內毒素與病原性的鑑定，動物醫學，2期82。
7. 陳清、謝快樂、吳義興、呂清泉、林再春（1979）：豬大腸桿菌症菌苗之研製，1種菌株腸毒素之測定與免疫血清之力價測定試驗，中華民國獸醫學會雜誌，5，53—60。
8. 陳清（1982）：臺灣における哺乳豚の下痢症由来 *Escherichia coli* に關する研究，日本北里大學博士學位論文。
9. 柏崎守（1973）：豚の大腸菌症に關する研究，日本北海道大學博士學位論文。
10. Arbuckle, J. B. R. (1968) : Observations on pre-weaning disease of pigs associated with *Escherichia coli*. Br. Vet. J., 124, 229-235.
11. Baljer, G. (1980) : Stimulation of an early protection after oral vaccination with inactivated *E. coli* organisms. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Con., Copenhagen, Denmark. 162.
12. Cardella, M. A., Huhn, R. C. & Wilson, M. R. (1974) : Immunity to neonatal colibacillosis : Field studies. J. Am. Vet. Med. Assoc., 164, 299-303.
13. Dean, A. G., Ching, Yi-chuan., Williams, R. G. & Harden, L. B. (1972) : Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice : Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125. 407-411.
14. Dobrescu, L., & Huygelen, C (1973) : Immunological studies in laboratory animals with enterotoxins from enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. Zentralbl. Veterinaermed., B 20, 222-229.
15. Donta, S. T., Moon, H. W. & Whipp, S. C. (1974) : Detection of heat labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science, 183,334-366.

16. Dorner, F., Mayer, P., and Leskova, R. (1980) : Immunity to *Escherichia coli* in piglets : The role of colostral antibodies directed against heat labile enterotoxin in experimental neonatal diarrhoea. Zentralbl. Veterinaermed., B 27, 107-221.
17. Gregory, D. W., & Cardella, M. A. (1976) : Potency assay of *Escherichia coli* immunizing agents : The mouse model, Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1976 Cong. Iowa, U. S. A.
18. Kohler, E. M. (1974) : Protection of pigs against neonatal enteric colibacillosis with colostrum and milk from orally vaccinated sows. Am. J. Vet. Res., 35, 331-338.
19. Kohler, E. M. Cross, R. F. & Bohl, E. H. (1975) : Protection against neonatal enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated sows. Am. J. Vet. Res., 36, 757-764.
20. Morgan, R. L., Issacson, R E., Moon, H. W., Brinton, C. C. & To, C. C. (1978) : 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.
21. Nagy, B., Moon, H. W., Isaacson, R. E., To, C.C. & Brinton, C.C. (1978) : Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. Infect. Immun., 21, 269-274.
22. Nagy, B., Ørskov, Ida. & Ratz. F. (1980) : Occurrence of the 987P antigen on enterotoxigenic *E. coli* of typical porcine serotypes. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1980 Cong., Copenhagen, Denmark, 140.
23. Olsson, E., & Söderlind, O. (1980) : Comparison of different assays for definition of heat stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. J. Clin Microbiol., 11, 6-15.
24. Pesti, L & Semjen, G. (1976) : Control of diseases caused by enteropathogenic *Escherichia coli* in Hungary. Proc. Int. Pig Vet. Soc. 1976 Cong., Iowa, USA. J 5.
25. Porter, P., Kenworthy, R., Holme, D. W., & Horsfield, S (1973) : *Escherichia coli* antigens as dietary additives for oral immunisation of pigs : Trials with pig creep feeds. Vet. Rec., 92, 630-636.
26. Wilson, M. R. & Svendsen, J. (1971) : Immunity of *Escherichia coli* in pigs : Serologic response of sows given formalin-treated live *Escherichia coli* vaccine. Am. J. Vet., Res 32, 891-898.
27. Wilson, M. R., (1981) : Enteric colibacillosis, Diseases of swine, Fifth edition, 471-477.

**IMMUNITY AND FIELD APPLICATION TESTS ON PILI  
ENTEROTOXINS VACCINE OF ESCHERICHIA COLI  
FOR SWINE**

Ching Chen, C. C. Lu, T. C. Lin<sup>1</sup>, H. K. Shieh<sup>2</sup>, N. J. Li, I. P. Chan,  
T. G. Chang, S.T. Lin, D. W. Horng<sup>3</sup>, J. S. Liang<sup>3</sup> and W. C. Chang<sup>4</sup>

*Escherichia coli* strains with pili and enterotoxins producible ability were used for vaccine production. The newly developed vaccine was used to immunize 56 experimental sows, 2 sows observed at the laboratory and 54 sows on two farms. Solid immunity but no side reaction was observed.

The anti-K88, K99 and 987P antibody titers arose from <1 or low levels to 32-2,048x in serum or colostrum whey of immunized sows determined by slide agglutination test, while anti-heat labile enterotoxin antibody titers were 4x in serum and  $\geq 32x$  in colostrum whey by immunodiffusion test.

For piglets that sucked the colostrum of immunized sows, the anti-K88, K99 and 987P antibody titers in serum were almost same as those of their mother sows. The average anti-heat labile enterotoxin antibody titers of piglets borne from the sow No. 1 and 2 kept at the laboratory were 3.6x and 6x respectively. In the field application, the average serum titers of piglets were 6.4x and 7.1x in farm A and B, respectively. Solid protection from challenge exposure with 10 ml of  $5 \times 10^{10}$  CFU/ml of enterotoxins and pili mixed cell suspension by stomach tube administration in piglets were demonstrated.

On the other hand, potency test in mice immunized by intraperitoneal inoculation was also conducted. The survival rate for vaccinated group was 100% (20/20) while control group was 0% (0/10) after the IP challenge with 0.1 ml cell suspension of enterotoxins and pili,  $8-9 \times 10^8$  CFU/ml.

---

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health,

1. Council for Agricultural Planning and Development, Executive Yuan.

2. Department of Veterinary Medicine, National Chung Shing University.

3. Taiwan Provincial Livestock Research Institute, Mio-Li Research Station.

4. Chia-Yi Hsien Livestock Disease Control Center.