

豬傳染性胃腸炎弱毒TO株田間試用

林榮培 賴秀穗 鍾明華

台灣省家畜衛生試驗所

林再春 林本欽

行政院農業發展委員會

為明瞭TGE弱毒TO株在自然環境下對仔豬免疫之效果，於發生豬傳染性胃腸炎之養豬場中，選取未感染部份母豬所生之初生仔豬，以 10^7 TCID₅₀之TO弱毒免疫接種，以觀其對仔豬之保護效力。結果經免疫者其育成率為97.5~100%，效果良好。而未免疫者其育成率僅69.4%。

免疫前及免疫後均採血分析其中和抗體產生之情形，結果母豬血清中TGE中和抗體價高者，其仔豬免疫後之抗體價均偏低，而母豬中和抗體價低於4倍或是4倍者，其仔豬免疫後之抗體價產生情形均很良好。

孕母豬於分娩前以 $10^{4.5}$ TCID₅₀之TO弱毒肌肉注射免疫一次者，分娩時血清中和抗體價為256倍，初乳中為1024倍。分娩前肌肉注射免疫一次及鼻腔接種一次者，於分娩時血清中TGE中和抗體價為512倍，初乳中為2048倍。

豬傳染性胃腸炎（簡稱TGE），三十餘年前（1946年）由美國的Doyle與Hutchings首次報告⁽⁸⁾，目前本病遍及北半球之溫帶及寒帶地方。本省由林再春等⁽¹³⁾於1958年首先發現於宜蘭縣，且很快蔓延至全省各地。據筆者等⁽¹⁾之調查報告（1976年），本病不但散佈全省，且有44.6%豬隻血清中含有本病之中和抗體，而以宜蘭縣之62%為最高。

本病為由冠狀病毒引起之豬急性傳染性腸道疾病，呈嘔吐及嚴重下痢，尤其哺乳仔豬感染本病後，其死亡率幾乎百分之百⁽⁶⁾⁽⁸⁾，故對以養豬為畜產主體的國家，具很大的威脅性，但至今尚無良好之預防方法可供使用。雖然現在美、日等國已製有活毒減毒疫苗供為肌肉及皮下注射之用，可是效果尚未臻理想⁽³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。且需注射二次，甚不方便。強毒之使用，雖免疫效果良好，但有接種損失及散佈病毒之危險，並非上策⁽³⁾，故亟須開發一有效而安全之疫苗，供TGE預防之用，以期對本病做有效之控制。

1975年古內氏⁽⁹⁾發表經初代豬腎細胞馴化之TO弱毒株對小豬不但甚安全，而且具

有免疫效果，接種小豬5天後即可防禦強毒之攻擊而不死亡，因而在疫苗之開發上出現了曙光。筆者等⁽²⁾也證明TO弱毒對仔豬甚安全，而且以一個月齡之小豬進行免疫結果，第5天時可防禦強毒之攻擊，但TO弱毒要使用於仔豬使其能防禦強毒，需要高力價之病毒，必需要達到 10^7 TCID₅₀才有效⁽²⁾，經研究以迴轉培養法增殖之結果，已可達此要求，現以此高力價之TO弱毒，試用於田間之初生仔豬及懷孕母豬，試其對TGE之防禦效果。

材料及方法

1 培養細胞及培養液：

培養用之細胞使用小豬腎臟製成之初代豬腎細胞，消化細胞時0.25% Trypsin 消化液中加入0.015%之disodium EDTA。生長用之培養液為Minimum Essential Medium (with Earle's salts) (簡稱MEM) 中加入10%小牛血清(GIBCO)，200 u/ml的盤尼西林，200 ug/ml的鏈黴素以及7.5%之NaHCO₃ 1%。維持用培養液除血清改為2%胎牛血清(GIBCO)，7.5% NaHCO₃ 改為2

%外，其餘相同。中和抗體試驗依照筆者以前使用之方法(1)。

2 試驗用病毒：

由日本分讓之 TGE 弱毒 TO-163 株(以下簡稱 TO 弱毒)，增殖於迴轉培養瓶上已形成單層細胞之初代豬腎細胞，於 34°C 暖房中迴轉培養增殖 40 小時後收集之，以凍結解凍法破壞細胞，放出病毒，以 Kaber 法測其病毒力價後，保存於 -70°C 供田間仔豬免疫接種用。前述之病毒於凍結解凍後，再於 4°C 下，以 4000 rpm 遠心 90 分鐘，收集上清液，測其病毒力價後，保存於 -70°C 備用。

3 試驗用動物：

細胞培養用之仔豬，於未發生 TGE、假性狂犬病、猪瘟等疾病之養豬場，選取健康良好之仔豬，採取其腎臟供用。

田間試驗之仔豬，選擇正發生 TGE 之養豬場，選取尚未感染 TGE 之母豬所生之仔豬進行免疫試驗。

母豬免疫試驗，選取健康良好之孕母豬，於試驗前採取血液分離血清，測其血中抗體，確定無 TGE 抗體者供試驗用。

4. 田間試用：

於 TGE 流行時，在正流行 TGE 之養豬場，選取尚未感染 TGE 之孕母豬所生之初生仔豬，出生後 48 小時以內者口服接種 TO 弱毒 10^7 TCID₅₀ /ml 1ml，出生後 48 小時以上者除口服外再加鼻腔接種，母豬則鼻腔接種同劑量之病毒，同時採血，供分離血清，測定抗體之用。然後以與往常同樣之方法飼養管理，觀察其防禦之效果。死亡之仔豬則記錄其症狀，並解剖之觀其小腸絨毛之變狀。免疫後一個月，任選一部份仔豬，採血進行 TGE 中和抗體測定。

5 母豬免疫：

孕母豬三頭，分別於分娩前 5~6 星期肌肉注射濃縮 TO 弱毒 $10^{8.5}$ TCID₅₀ /ml 10ml，分娩前 2 星期鼻腔接種濃縮 TO 弱毒 10^9 TCID₅₀ /ml 10ml，分娩後採血及初乳，測其血中及初乳中抗體，觀其抗體產生之情形。

結 果

(一) 田間仔豬免疫結果：

1 屏東 A 牧場共飼養豬隻 1,200 頭，母豬佔 320 頭，於發生 TGE 後共分二次前往該場進行初生仔豬 TO 弱毒口服接種，第一次接種 4 窩仔豬共 39 頭，第二次接種 5 窩仔豬共 41 頭，全部接種仔豬總共 80 頭，接種量為 10^7 TCID₅₀ /ml 1ml，結果除 2 頭仔豬下痢死亡外，其餘均健存。育成率 97.5%。接種時任選 4 頭母豬採血分離血清，接種後任選小豬 12 頭採血，測其血中抗體價，結果詳如表一。

另外屏東 B 牧場共接種 2 窩 17 頭仔豬，C 牧場也接種 2 窩仔豬共 24 頭，接種後均未發現感染 TGE 者。

2 員林 D 養豬場於發生 TGE 時，前往免疫接種，選取尚未感染 TGE 之母豬所生之仔豬，共接種 20 窩，接種仔豬總共 193 頭，接種仔豬之同時任選 13 頭母豬採血分離血清，供抗體測定之用。一個月後隨機選取免疫小豬(其母豬已採血者)採血測其抗體，結果詳如表 2。所有免疫之仔豬僅一頭被母豬壓死外，其餘均健存。未免疫之對照組 14 窩共 134 頭仔豬，其中因下痢而死亡者共 41 頭，死亡率 30.6%。

該場正感染 TGE 之母豬任選二頭採血，並於一個月後再度採血，測其血中 TGE 中和抗體價，並記錄其仔豬存活數，結果詳如表 3。

表 1 屏東 A 牧場 TO 弱毒免疫接種時母豬及免疫後小豬血中 TGE 中和抗體價

豬 號	免疫接種前母豬 中和抗體價	接種後一個月小豬中和抗體價								
		4*	8	16	32	64	128	256	512	1024 X
0024	4 ↓* ³					1	2* ¹			
0672	4 ↓						2	1		
3038	16 X		1		1	1				
3044	32 X	1			2					

* 1：血清稀釋倍數

* 2：小豬頭數

* 3：4 倍以下

表2 員林D牧場TO弱毒免疫接種時母豬及免疫後小豬血中TGE中和抗體價

豬 號	免疫接種前母豬 中和抗體價	接種後一個月小豬中和抗體價								
		4* ¹	8	16	32	64	128	256	512	1024 X
596	4↓ * ³				1**			1		
58	4↓					1		1		
1400	4↓					1	2	1	1	
262	4 X				1	1				1
644	16 X			1			1	1		
369	16 X		1	1	1					
2	16 X	1								
257	32 X	1		1	1					
75	32 X			1	1					
51	64 X				1					
850	64 X		2		1					
851	64 X		3					1		
855	64 X	2	2							

* 1 : 血清稀釋倍數

* 2 : 仔豬頭數

* 3 : 4 倍以下

表3 員林D牧場母豬感染TGE時及感染後一個月之血清TGE中和抗體價

豬號	感染TGE時抗體價	感染一個月後之抗體價	仔豬存活數
3856	4↓*	32 X	0
1200	4↓	64 X	0

* 4 倍以下

由表1及表2觀之，免疫接種時母豬無TGE抗體或抗體力價較低者，仔豬免疫後一個月時之中和抗體價均較高，而母豬於免疫接種時即具有較高力價之TGE抗體者，其仔豬於免疫一個月後之抗體均較低。

由表3得知該牧場確實感染TGE，而且仔豬全部死亡者，其母豬血清中均未具TGE中和抗體。

(三) 孕母豬免疫：孕母豬3頭，一頭於分娩前三星期肌肉注射濃縮⁽¹⁵⁾ TO弱毒 $10^{8.3}$ TCID₅₀/ml 10ml，分娩時採血及初乳，測其抗體產生情形，結果血清中TGE抗體為256倍，初乳中則有1024倍。另2頭於分娩前5星期及6星期肌肉注射濃縮 TO弱毒 $10^{8.3}$ TCID₅₀/ml 10ml，分娩前2星期鼻腔接種濃縮 TO弱毒 10^8 TCID₅₀/ml 10ml，分娩後採血及初

表4 TO弱毒在員林D牧場對初生仔豬之保護效力

	免疫組	對照組
試驗頭數	193	134
死亡頭數	0*	41
死亡率	0%	30.6%

* 意外死亡一頭未計在內

乳，其血中TGE中和抗體為512倍，初乳中為2048倍。

討 論

豬傳染性胃腸炎自從1946年首次報告⁽⁸⁾至今，尚無良好之預防對策。主要原因為TGE病毒之特性及產生免疫之方式特殊⁽⁷⁾，與豬瘟等疾病不同，其被動免疫之機構，為乳源免疫⁽¹²⁾，與分泌性局部免疫抗體之產生有關⁽¹³⁾。TGE病毒主要以腸道及呼吸道之粘膜上皮細胞為傳染對象⁽¹⁸⁾，此時產生大量的粘膜抗體，即分泌性IgA⁽¹¹⁾，其量每超過血清中抗體價，隨局部分泌液而分佈於粘膜表面及乳汁中，成爲一種局部免疫機構，以抵抗TGE之再感染。仔豬必須攝食免疫母豬乳汁以獲得分泌性IgA抗體，中和侵入腸道之病毒，以防止

小腸粘膜受害⁽⁴⁾⁽⁵⁾。弱毒疫苗之效果不佳⁽¹⁴⁾，可能與抗原構造之改變而使分泌性 IgA 之產生發生變化有關。如能找到一病原性低而抗原構造未改變之弱毒，則可解決此問題。或是以無病原性之弱毒直接使用於初生仔豬，以達保護之目的。依筆者⁽²⁾以往之試驗及本試驗之結果觀之，TO 弱毒可達此目的。

TO 弱毒在接種量少時，防禦效果較差⁽²⁾，高濃度 (10^7 TLID₅₀以上) 接種則效果良好。本試驗中再度證明此點。母豬血清中無 TGE 抗體或抗體價較低者，則仔豬免疫後其血清中抗體價較高，反之母豬血清中抗體價較高者則仔豬免疫後之抗體價則偏低，此點可能在將來田間大規模使用時必須再加以探討。但由本試驗之結果觀之，TO 弱毒對初生仔豬之保護效力高達 97.5%~100%。

野外試用結果，僅屏東 A 牧場免疫之 80 頭仔豬中死亡 2 頭，這 2 頭可能因免疫後不久即感染了強毒，因 TO 弱毒須到第 5 天才能完全防禦強毒之攻擊⁽²⁾，而在這免疫接種直後到第 4 天之間，因無法完全防禦強毒，故而有部份會發病而死亡。

以 $10^{9.3}$ TCID₅₀ 之 TO 弱毒免疫母豬一次或二次，可使其血中 TGE 中和抗體分娩時達到 256 倍及 512 倍，初乳中更可達到 1024 倍及 2048 倍，如果依照日本化血研 TGE 活毒疫苗之標準，血清中和抗體力價達到 128 倍即屬有效的話，則本 TO 弱毒之效力，較之高出甚多。

致 謝

本試驗承蒙農復會之經費補助而完成，謹申謝忱。

1. 林榮培、鍾明華、鄭建盛、傅祖慧、張光正、費昌勇、林再春 (1976) 臺灣地區豬傳染性胃腸炎抗體分佈調查。臺灣省畜衛試研報 13: 45~51。
2. 林榮培、鍾明華、鄭建盛、賴秀穗、傅祖慧、林再春 (1977) 傳染性胃腸炎弱毒 TO 株對小豬免疫之研究。臺灣省畜衛試研報 14: 31~40。
3. 清水悠紀臣 (1976) 豚傳染性胃腸炎とその免疫。日獸會誌 29: 539~546。
4. 清水悠紀臣 (1976) 乳汁 IgA と受動免疫。代謝 Vol. 13 No. 7 特集乳汁。

5. Bay, W. W., Doyle, L. P. & Hutchings, L. M. (1953) Transmissible gastroenteritis in swine: A study of immunity. J. A. V. M. A., 122, 200.
6. Bohl, E. H. (1970) Transmissible Gastroenteritis, In Disease of Swine, Edited by H. W. Dunne. Iowa State University Press. Ames. Iowa. 158~176.
7. Bohl, E. H., Gupta, R. K. P. & McCloskey, L. W. and Linda. J. Saif (197) Immunology of Transmissible Gastroenteritis. J. A. V. M. A., 160, 543-549.
8. Doyle, L. P. and Hutchings, L. M. (1946) A Transmissible Gastroenteritis in Pigs. J. A. V. M. A., 257-259.
9. Furuuchi, S., Shimizu, Y. & Kumagai, T. (1975) Comparison of Properties between virulent and attenuated strains of Transmissible gastroenteritis Virus. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. Vol. 15, 159-164.
10. Furuuchi, S., Shimizu, Y. & Kumazai, T. (1976) Vaccination of newborn pigs with an attenuated strain of transmissible gastroenteritis Virus. Am. J. Vet. Res. Vol. 37, No. 2, 1401-1404.
11. Genco, R. J. & Tabuman, M. A. (1969) Secretory Gamma A Antibodies Induced by Local Immunization. Nature, 221, 679-681.
12. Hachterman, E. O. (1965) Lactogenic Immunity to TGE of Pigs. J. A. V. M. A., 147, 1661.
13. Huang, W. T. and Lin, T. C. (1958) An Outbreak of TGE-like Disease in pigs, in Yi-Lan Prefecture. Exp. Report of Taiwan Provincial Vet. Serum Inst. No. 2. 43-48.
14. Ma, C. H., Liu, F. Y., Ceal yen, C. C., Wang, S. C., Lai, S. S. and Hong, C. B. (1974) Determination of Safety and the Immunological Response of Pigs to T. G. E. Vaccines, Annim. Ind. Res. Inst. Taiwan Sugar Corporation Animal Research Report. 311-328. July 1973-June 1974.
15. McSharry, J. & Benzinger, R. (1970) Concentration and purification of vesicular Stomatitis Virus by polyethylene glycol "Precipitation". Virology 40, 745-779.
16. Morilla, Antonic and Ristic, Miodrag (1973) Immunology Discrepancy Between Intestinal and Cell Culture Virus of TGE on Swine. Am. J. Vet. Res. 34:12, 1533-1538.
17. Saif, Linda J., Bohl, E. H. and Gupta, R. K. P. (1972) Isolation of Procine Immunoglobulins and Determination of the Immunoglobulin Classes of Transmissible Gastroenteritis Viral Antibodies. Infect. & Immun. 6, 600-609.
18. Underdohl N. R., Mebus, C. A., Stair, E. L., Rhodes. M. B., McGill, L. D. and Twiehaus, M. J. (1974) Isolation of Transmissible Gastroenteritis Virus from Lungs of Market-weight Swine. Am. J. Vet. Res. Vol. 35, No. 9 1209-1216.

The Field Test of Attenuated TGE-TO Virus

Y. P. Lin, S. S. Lai and M. H. Jong
(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)
T. C. Lin, P. C. Lin
(Council for Agricultural Planning and Development Executive Yuan)

Summary

80 and 193 newborn pigs inoculated with the attenuated TO strain (10^7 TCID₅₀) 78 and 192 of them grew up with the growth rate being 97.5-100%.

TGE neutralizing antibody was studied for sera and colostrums collected from sows which were inoculated twice at the 75th and 96th days after conception. Examination of TGE neutralizing antibody titers revealed a level of titer 256-512x in serums and 1024-2048x in colostrums at farrowing.