

猪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

陳清¹ 謝快樂¹ 吳義興¹ 呂清泉¹ 林再春²

摘 要

25株大腸桿菌，以家兔腸結紮試驗，測定其耐熱性腸毒素 (Heat-stable enterotoxin簡稱ST) 之產生，及易熱性腸毒素 (Heat-labile enterotoxin簡稱LT) 之含有情形，其結果得知能產生耐熱性腸毒素者有12株，含有易熱性腸毒素者有9株，兩者均未能測出者有10株，而兩種腸毒素均能測出者僅有6株。且由本試驗得知能產生 ST 菌株，未必含有 LT，而含有 LT 菌株者亦非均能產生 ST。

使用10~12%光電比色計濃度之 OK 抗原 (Approx. $4-5 \times 10^9$ CFU/ml density)，行家兔免疫之結果，所得之免疫血清以平板交叉凝集反應試驗之結果，得知除對同型抗原有特異凝集反應外，對於某些異型抗原亦能呈現強弱不等之類緣凝集反應。至於對同型抗原之試管凝集反應力價，自 $\times 200 \sim \dots \times 25,600$ 倍不等。

由平板交叉凝集反應試驗之結果，得知 G1253 (0147:K89、K88ac)，E145 (0141:K85ac)，E57 (0138:K81)，V189 (0108:K“V189”) 及 V50 (010:K“V50”) 等5株抗原，對於各不同菌型免疫血清之凝集性較為敏感。

緒 言

引起猪隻以下痢為主徵的傳染病，主要有猪大腸桿菌症 (Colibacillosis)，猪傳染性胃腸炎 (Transmissible gastroenteritis) 及猪赤痢 (Swine dysentery) 等。其中大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 於1885年首由 Buchner 從幼兒糞便中分離成功，1886年 Escherich 作更進一步的研究與敘述，本菌廣佈於自然界，尤以人類及動物之腸管中^(1,24)。

至於由大腸桿菌所引起之猪疾病，如早發性大腸桿菌症 (Neonatal colibacillosis)，小豬白痢 (White scour) 及水腫病 (Edema disease) 等，其中尤以早發性大腸桿菌症，由於死亡率高，污染率日漸普遍，且尚無可靠之預防及有效之治療法，因此對於經濟上之損失最為嚴重。

除此之外，病原性大腸桿菌還會引起或併發乳房炎，流產、肺炎、心內膜炎及子宮內膜炎等等，世界各國均極重視，本省亦不例外。陳等^(4,5,6)、張等⁽⁷⁾、Weng等⁽³⁰⁾ 曾以各種抗菌物質對大腸桿菌行感受性之探討。Dean等⁽¹³⁾、Dobrescu等⁽¹⁴⁾、Gyles等⁽²⁰⁾、Klipstein等⁽²¹⁾、Smith等^(2,28) 對於大腸桿菌菌株腸毒素 (Enterotoxins) 均有深入之研究。至於有效菌苗之開發研究，如林等⁽²⁾、嚴等⁽⁸⁾、Dobrescu等⁽¹⁵⁾、Gregory等⁽¹⁹⁾、Kohler⁽²²⁾、Kohler等⁽²³⁾、Nagy等⁽²⁵⁾、Porter等⁽²⁶⁾、Svendensen等⁽²⁹⁾ 及 Wilson等⁽³¹⁾ 在免疫用菌苗之製造，投藥方式及菌苗檢定之研究，更是

1 臺灣省家畜衛生試驗所

2 農復會畜牧生產組

抽印自中華民國獸醫學會雜誌5卷1期53-60, (1979)。

Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep., 14:11-20 (1977)

不遺餘力。

大腸桿菌迄至目前為止，至少有153種 O 抗原，92種 K 抗原及 5 種 H 抗原⁽¹⁰⁾。至於腸毒素之研究，已知有耐熱性腸毒素 (Heat-stable enterotoxin 稱 ST) 及易熱性腸毒素 (Heat-labile enterotoxin 稱 LT) 二種，而兩者在小豬之大腸桿菌症中扮演不同之角色⁽¹⁴⁾。

本省張等⁽⁷⁾曾在屏東地區，由仔豬下痢便病材 649 件中分離出287株病原性大腸桿菌，其分離率為44%。Weng等⁽³⁰⁾亦由300個小豬白痢便中，分離出212株之病原性大腸桿菌，其分離率達70%。又林等⁽³⁾報告本省南部地區四個養豬場在二個月之間，約有 10,000頭初生仔豬死於大腸桿菌症，且嘉義某豬場幾乎有 100%之發生率，死亡率高達85%。由此可見豬大腸桿菌症對於本省養豬事業之威脅甚大。

為防止該病之為害，提高仔豬之育成率，除加強飼養管理，改善環境衛生及仔豬之保溫外，有效菌苗之開發，免疫懷孕母豬，使仔豬經由初乳獲得被動免疫，以保護初生仔豬，是我們研究目標之一，而有效菌苗之開發研究，首重種菌株之選擇，本文即係種菌株之腸毒素測定，及試製家兔免疫血清之力價試驗報告。

材料與方法

一、試驗材料：

1. 供試菌株：由臺灣養豬科學研究所分讓 CVL 英國贈送之大腸桿菌17株，美國農業部家畜疾病研究所 Dr. David. W. Gregory 贈送 3 株，本所原保存供菌苗製造用 2 株，及筆者（陳）由仔豬下痢病材所分離之病原性大腸桿菌 3 株，共25株。
2. 供試家兔：係向農家選購健康家兔，體重在 2~2.5 公斤者，供為免疫血清製造及菌株腸毒素測定之用。
3. 培養基：係使用美國 Difco 牌 Tryptic soy agar, Tryptic soy broth, Soft agar medium 及 YPC agar 等。

二、試驗方法：

1. 種菌株腸毒素之測定：仿照 Gyles and Barnum⁽²⁰⁾、Smith and Halls⁽²⁷⁾ 及 Smith and Gyles⁽²⁴⁾ 等方法實施。

耐熱性腸毒素 (ST) 之測定—使用 Soft agar cultures 與 Tryptic soy broth 24—36 小時之培養液，經 10,000 RPM (Beckman, JA—20 Rotor) 遠心 30 分鐘之上清液，溫水槽中加熱 65°C 10 分鐘，每 ml 加入 200 單位之青黴素及 0.5mg 之鏈黴素以抑制腸管中病原性菌之生長，家兔每一小腸結紮注射 5ml。

易熱性腸毒素 (LT) 之測定—Agar cultures 24 小時培養之洗液，使用 10~12 % Transmittance (Erma、Photoelectric colorimeter、AE22、620nm) saline suspension，經超音波 (Magason、Ultrasonic disintegrator 20 kcs 300/600 watts) 擊碎處理 5~10 分鐘，再經 10,000 RPM 遠心 30 分鐘之上清液，加入同 ST 測定用劑量之抗生素後保存—20°C 供為接種之用，注射量亦為 5ml。所用家兔於手術前絕食 24—36 小時，僅給飲水。

2. 家兔免疫血清之製備：參考 Porter et al⁽²⁶⁾、Edwards and Ewing⁽¹⁷⁾，日本農林省家畜衛生試驗場大腸菌之 O 羣血清型別法⁽¹⁰⁾，柏崎^(11,12) 及嚴家清與王貞富二位先生等私函資料，加以免疫製造。分五次免疫注射，其劑量為 0.2ml → 0.5ml → 1.0ml → 2.0ml → 4.0ml 間 5 天，最後免疫後 7—10 天採血分離血清備用。
3. 免疫血清力價測定：交叉凝集反應係使用急速平板凝集反應，而試管凝集反應，其血清稀釋自 ×100………51,200 之二倍稀釋法⁽¹⁰⁾ 加以測定。所用抗原，急速交叉凝集反應使用原供

免疫血清製造用之抗原，即其菌液濃度約為 $4-5 \times 10^9$ CFU/ml。而試管凝集反應用抗原，則使用前述濃度之二倍稀釋菌液。

結 果

一、各菌株腸毒素測定之結果：

各菌株依前述試驗方法，製備之接種液接種於家兔結紮之腸管，經18~20小時後剖檢檢查之結果，所得成績如表1，及圖2, 3。由表1得知供試25株中，能測出產生 ST，使腸管膨脹及有多量滲出液者有12株，經超音波處理菌體中含有 LT，能使被接種腸結紮膨脹及有多量滲出液者有9株。兩者均未能測出者有10株，而兩種腸毒素均能測出者僅有6株。且由試驗結果得知，能產生 ST 者，未必含有 LT，而含有 LT 菌株者亦非均能於培養液中產生 ST。

二、各菌株所製成家兔免疫血清之力價：

將所製成之免疫血清一滴（約 0.025ml）和抗原一滴混合應用平板急速凝集反應之結果；得知每一菌株之免疫血清，除對其原抗原呈現高度敏感之特異凝集反應外，對於其他部分菌株抗原亦能呈現強弱不等之類緣凝集反應，詳如圖1。至於以試管行凝集反應之結果，其力價高達12,800~25,600倍者有3株，3,200~6,400倍者有8株，200~1,600倍者有14株，詳如表2。由表2得知各菌株抗原之濃度一定，注射次數與劑量亦相同，但所製成之血清力價並不一致。由平板交叉凝集反應試驗之結果，得知 G1253 (0147: K89K88ac)，E145 (0141: K85ac)，E57 (0138: K81)，V189 (0108: K"V189") 及V50 (010: K"V50") 等5株抗原，對於各不同菌型免疫血清之凝集性較為敏感。

Table 1. ST and LT Enterotoxins Produced from E. coli Strains

Strain	Antigenic formula	Enterotoxins Produced		Remarks
		ST	LT	
Abbotstown	0149: K91, K88 ac.	+	+	
G1253	0147: K89, 83 ac.	+	-	
G7	08: K87, 83 ab	-	+	
G203	08: K87, 88 ac.	+	+	
E145	0141: K85ac	+	+	
E57	0138: K81	+	-	
G491	0138: K81, 83 ac.	+	+	
G4166	045: K65, 88 ac	+	+	
P16	09: K"V16" (A)	+	-	Hemorrhaged on ST test.
V142	064: K"V142"	-	-	
V189	0108: K"V189"	-	-	
E4	0139: K82 (B)	-	-	
V17	0"V17"K"V17"	-	-	
V50	010: K"V50"	-	-	

(14)

E68 type 1	0141 : K85abK88ab	+	-	Red-brown color fluid
V113	0119 : K"V113"	-	-	
D214	0100 : K"214"K88ab	-	-	
72-2502	0149 : K88, 91, H19.	+	+	
New Troyer	09 : K35 : NM.	+	-	
Old Troyer	0101 : K30 : NM.	+	-	
Shin-diann	ND	-	-	
E. 459	ND	-	-	
Chyi-ding 1	ND	-	+	
Chyi-ding 2	ND	-	-	
Chyi-ding 3	ND	-	+	

ND : not determined

Table 2. Tube Agglutination Titer of Immune Sera against Homologous Antigen of *E. coli* Strains.

Kind of Antisera	Agg. titer	Kind of Antisera	Agg. titer
E 145	x 25,600	D 214	x 1,600
Chyi-diing 1	x 25,600	72-2502	x 1,600
V 50	x 12,800	G 4166	x 800
Abbotstown	x 6,400	P 16	x 800
G 1253	x 6,400	G 7	x 400
E 57	x 6,400	New Troyer	x 400
V 189	x 3,200	V 142	x 200
E 4	x 3,200	V 17	x 200
E 68 type 1	x 3,200	V 113	x 200
shin-diann	x 3,200	Old Troyer	x 200
Chyi-diing 2	x 3,200	E. 459	x 200
G 205	x 1,600	Chyi-diing 3	x 200
G 491	x 1,600		

Remarks : Twofold diluted of the 10-12% transmittance bacterial suspension (Approx. $4-5 \times 10^9$ CFU/ml density) for Antigen were used on the agglutination test.

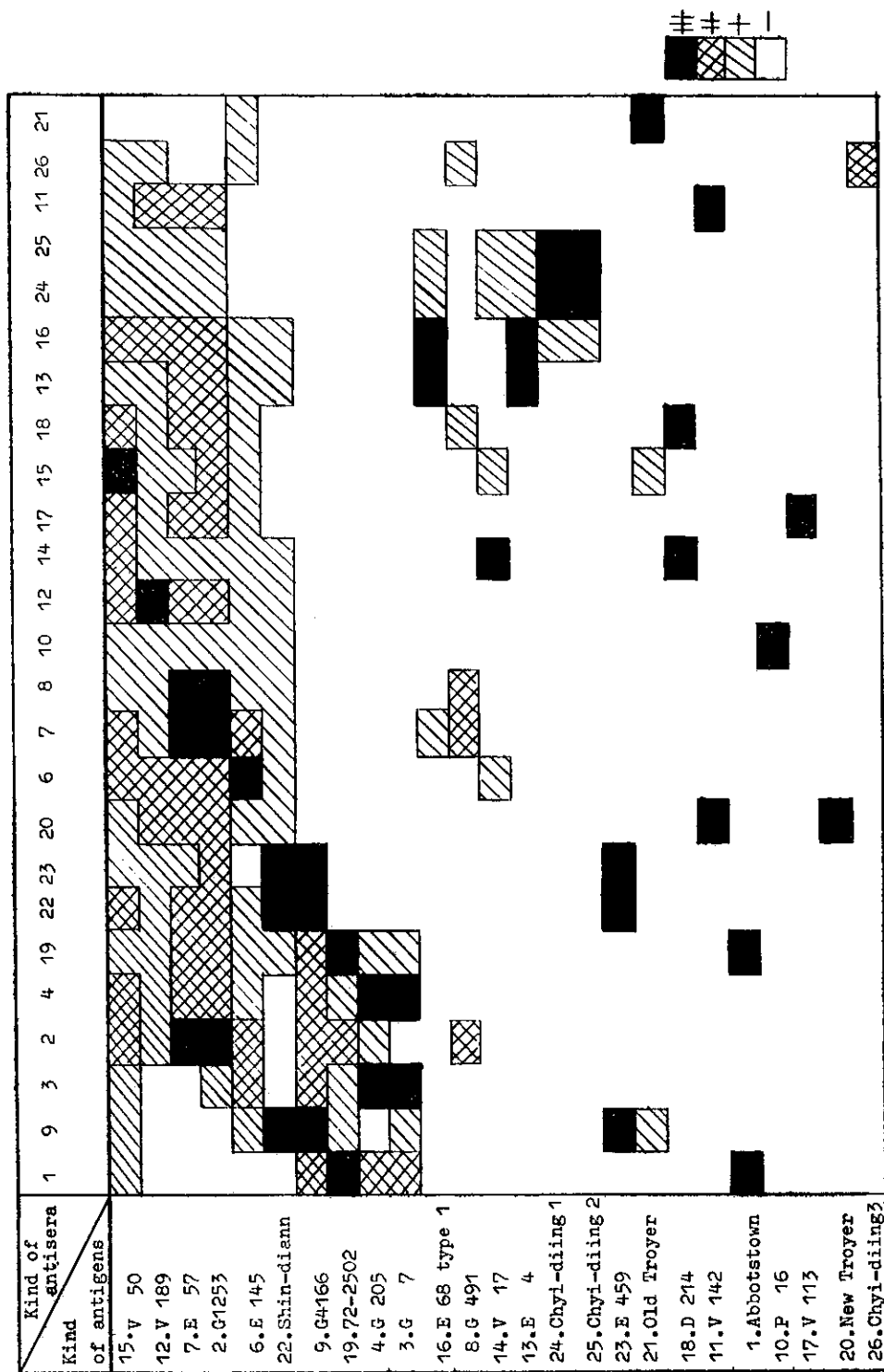


Fig. 1 : Cross Reactions of Immunized Sera Against Homologous & Heterologous Antigens of E. coli Strains.

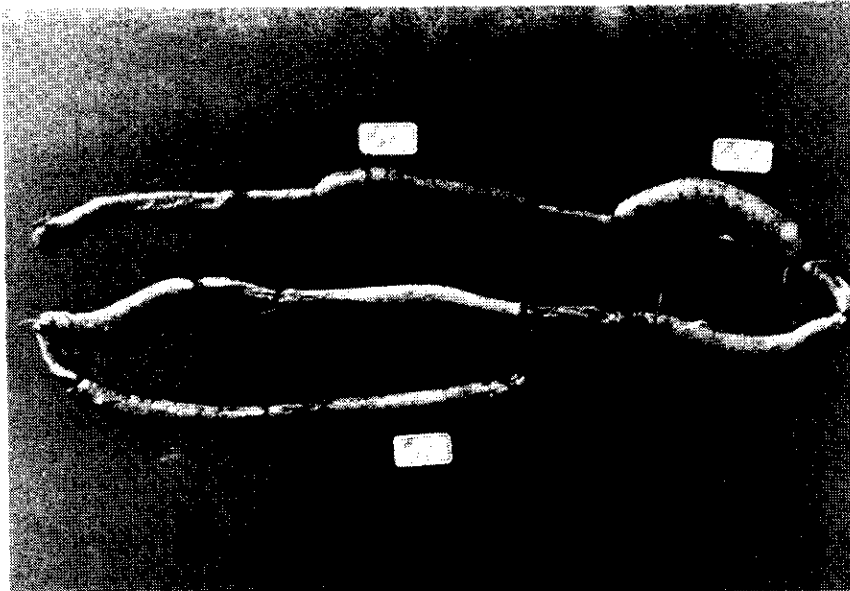


Fig. 2-Ligated segments of rabbit intestine after inoculation of enterotoxin preparations produced by strains of *E. coli*. The dilatation and hemorrhagic serosa of intestine ligated segments were observed. (# 20 & 21)

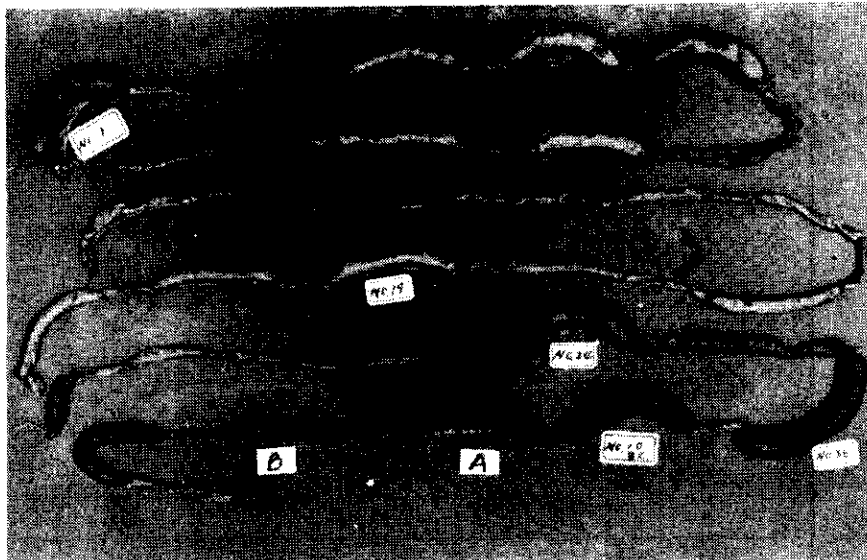


Fig. 3-Ligated segments of rabbits intestine after inoculation of LT enterotoxin preparations produced by strains of *E. coli*. The dilatation and some hemorrhage segments were observed. A=Broth only, B=Saline only.

討 論

豬大腸桿菌症所引起之經濟損失，已引起世界各國之重視，尤以早發性大腸桿菌症之為害最為嚴重。而近年來對於病原性大腸桿菌之鑑定，Dobrescu 等⁽¹⁴⁾，Gyles 等⁽²⁰⁾，Smith等^(27,28)咸認 LT 才是真正的致病因子，可引起仔豬嚴重下痢、脫水而致死，而 ST 只能引起微弱的下痢現象。雖然 Smith及Gyles 等報告除某些病原性大腸桿菌僅能產生 ST 腸毒素外，其餘含有 LT 菌株者亦均能產生 ST，惟據筆者等由25株大腸桿菌經測定之結果與彼等之報告略有出入，即能產生 ST 者未必含有 LT，而含有 LT 菌株者亦非均能產生 ST，已詳如表 1。在本試驗中 E57 及 New Troyer 等菌株之成績與 Eillis 及 Kienholz⁽¹⁸⁾ 所報告應用 Suckling mouse (SM) 及 Y-1 Adrenal cell cultures所得 S. T. 與 L. T. 之成績完全相符。而 G205 菌株含有 L. T. 之成績與 Eillis 及 Kienholz 報告應用 Y-1 腎上腺細胞培養法亦相一致，惟一G205 菌株之 ST 成績有所差異，似因 ST 產生微弱而影響判定。

另本報告中，ST 部分之 E57 與 P16二株，LT 部分之 Abbostown、G7、E145、G205、G4166、及G491 等 6 株所得之成績均與嚴等⁽⁹⁾ 應用乳鼠胃內接種法及 Y-1 腎上腺細胞培養法所得成績相符，其餘部分某些菌株之成績則有所出入，是否因材料與方法之不同而有所差異，尚待探究。

至於免疫血清試管凝集反應試驗結果，得知雖然免疫用 OK 抗原濃度一定，免疫注射量與次數亦相同，但所得之血清力價並不一致，是否由於菌株本身抗原性之差異，或家兔個體之影響，尚無法確定，擬進一步探討。且其血清力價之高低與菌株腸毒素之有無及種類之相關性，亦難加以定論。惟在平板交叉凝集試驗中，呈現凝集性敏感之 G1253、E145、E57、V189 及 V50 等 5 株抗原，其免疫所得血清之力價均在3,200~25,600倍之間，顯然有選供凝集反應用抗原之價值。

誌 謝

本研究承蒙農復會 78-A21-J-964(3) 經費之資助，臺灣養豬科學研究所贈送CVL 英國菌株，及美國農業部家畜疾病研究所 Dr. D. W. Gregory 贈送大腸菌株，深表由衷的感謝。在研究進行中承蒙臺糖公司畜產研究所嚴家清和王貞富兩位先生之鼓勵，本所陳所長守仕博士之指導及詹主任益波之諸多協助，謹併誌萬分之謝忱。

參考文獻

1. 林明豐、林地發、陳清、林再春，1972：不同種類動物糞便由來大腸菌生化性狀之觀察，臺灣省畜衛研報，9期、63—72。
2. 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期、23—29。
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期、15—22。
4. 陳清、柏崎守、波岡茂郎，1973：厭氧狀況下豬隻由來大腸菌對於 Carbadox 之感受性，臺灣省畜衛試研報、10期、41—45。
5. 陳清、林再春、林榮培、林地發、林明豐，1973：不同種類動物糞便分離大腸菌對於化學療法劑之感受性及其 R 因子之傳達，臺灣省畜衛研報、11期、89—96。
6. 陳清、張永富、林地發、傅和美、李永林、王雅娟、邱朝齊，1974：無添加抗菌劑飼料育成初代 SPF 小豬，其糞便中大腸菌對化學療法劑之感受性及其 R 因子之研究、臺灣省畜衛研報、11期、97—102。
7. 張照夫、蘇金田、董明澄，1975：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。
8. 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。
9. 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。
10. 農林省家畜衛生試驗場，1971：大腸菌のO羣血清型別法，單行本。
11. 柏崎守，1973：豚の大腸菌症に關する研究，博士學位論文。
12. 柏崎守，1977)：大腸菌症，豚病學，近代出版、411~421。
13. Dean Andrew G., Yi-chuan, Ching., Ronald G. Williams and Lewis B. Harden : 1972 : Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice : Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. The Journal of Infection Disease, Vol. 125, No 4, 407-411.
14. Dobrescu Lucia and C. Huygelen. 1973 : Immunological studies in laboratory animals with enterotoxins from enteropathogenic escherichia coli strains of porcine origin, Zm. Vet. Med. B. 20, 222-229.
15. Dobrescu L., and C. Huygelen. 1976. Protection of piglets against neonatal E. coli enteritis by immunization of the sow, with a vaccine containing heat-labile enterotoxin (LT) . 1. Protection against experimentally induced diarrhoea. Zm. Vet. Med. B. 23, 79-88.
16. Dune, Howard, W., 1975. Colibacillosis and edema disease, Diseases of Swine. fourth edition, p. 650-686.
17. Edwards P. R., and W. H. Ewing., 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed., Atlanta. Georgia Burgess Publishing Company. 67-107.
18. Ellis, R. P., and J. C. Kienholz. 1976. Detection of enteropathogenic E. coli : Comparison of porcine gut ligation, sucking mouse inoculation, and Y-1 adrenal cell

- assays, International Pigs Veterinary Society. Ames. Iowa. U. S. A.
19. Gregory, D. W., and M. A. Cardella. 1976. Potency assay of *Escherichia coli* immunizing agents : The mouse model. International Pig Veterinary Society. Ames. Iowa. U. S. A.
 20. Gyles Careton L., and Donald A. Barnum., 1969. A heat-labile enterotoxin from strains of *escherichia coli* enteropathogenic for pigs. The Journal of Infection Disease. Vol. 120. No. 4. 419-426.
 21. Klipstein Frederick A., Chung-seng Lee., and Richard F. Engert 1976. : Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by In Vivo perfusion in the rat jejunum, Infection and Immunity, 1004-1010.
 22. Kohler E. M., 1974. Protection of pigs against neonatal enteric colibacillosis with colostrum and milk from orally vaccinated sows. Am. J. Vet. Res., Vol. 35. No. 3. 331-338.
 23. Kohler E. M., R. F. Cross., E. H. Bohl., 1975. Protection against neonatal enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated sows. Am. J. Vet. Res., Vol. 36. No. 6. 757-764.
 24. Merchant, I. A., and Packer R. A., 1967. Veterinary bacteriology and virology. 7th ed., 273-277.
 25. Nagy, B., H. W. Moon., R. E. Isaacson., C. C. To., and C. C. Brinton. 1978. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. Infection and Immunity, Vol. 21, No. 1 269-274.
 26. Porter, P., R. Kenworthy., D. W. Holme., and S. Horsfield. 1973. *Escherichia coli* antigens as dietary additives for oral immunisation of pigs. Trial with pig creep feed. The Veterinary Record. June 16th. 630-635.
 27. Smith, H. Williams and S. Halls. 1967. Studies on *escherichia coli* enterotoxin, Path. Bact. Vol. 93. 531-543.
 28. Smith, H. Williams and C. L. Gyles. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. Vol. 3. 387-401.
 29. Svendsen J. and M. R. Wilson. 1971. 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. Vol. 32. No. 6. 899-904.
 30. Weng Chung-Nan., J. L. Liu., and C. H. Ma, 1976. Serotype and drug susceptibility of *escherichia coli* isolated from healthy and scouring piglets. International pigs veterinary society. Ames. Iowa. U. S. A.
 31. Wilson M. R., and J. Svendsen. 1971. Immunity to *escherichia coli* in pigs. Serologic response of sows given formalin- treated live *escherichia coli* vaccine. Am. J. Vet. Res. Vol. 32. No. 6. 891-898.

Studies on Production of Vaccine for Swine Colibacillosis

1. The Enterotoxin Determination and Immune Sera Titration of the Seed Strains of *E. coli*.

Chen, C.¹, H. K. Shieh.¹, Y. S. Wu.¹, C. C. Lu.¹, and T. C. Lin².

Summary

Twenty-five strains of *E. coli* swine origin, were used to determine the production of heat-stable enterotoxin (ST) and heat-labile enterotoxin (LT) by means of rabbit intestine ligated test. Twelve of the strains produced ST, 9 strains LT, and 10 of the strains contained neither of the enterotoxin. Only 6 of them produced both kinds of enterotoxins.

The OK antigens were prepared from individual culture of the strains. A concentration of 10-12% transmittance by the photoelectric colorimeter (containing about $4-5 \times 10^9$ CFU/ml density) of the bacterin was employed to immunize the rabbit, two rabbits for each strain. Four boosters were performed at an interval of five days. Serum was collected one week after the last inoculation, and stored at -20°C before use. The results of plate agglutination tests indicated that the hyperimmune serum reacted specifically and strongly with homologous strain, and some with heterologous strains with varying degree of intensity. The serum titers were varying from $\times 200$ to $\times 25,600$ by means of tube agglutination test.

It was noted that the antigen of strains G1253 (0147 : K89 K88ac) , E145 (0141 : K85 ac) , E57 (0138 : K81) , V189 (0108 : K"V189") , and V50 (010 : K" V50") reacted with much more heterologous immune sera than those of other strains.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
2. Joint Commission on Rural Reconstruction.