

*Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Infektions- und Seuchenmedizin, Fachbereich Tiermedizin,  
Ludwig Maximilians-Universität München*

*Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr*

## **Versuche zur Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine**

### **III. Passiver Immuntransfer nach oraler Impfung trächtiger Sauen mit dem attenuierten TGE-Virusstamm Bl<sup>1</sup>**

Von

R. G. HESS, P. A. BACHMANN und A. MAYR

*Mit einer Abbildung und 2 Tabellen*

*(Eingegangen am 6. Januar 1978)*

### **Einleitung**

Alle Bemühungen, eine wirksame Immunprophylaxe gegen die übertragbare Gastroenteritis zu entwickeln, haben bisher nicht zu praxisreifen Produkten geführt (7, 27). Auch die Fütterung von Rekonvaleszentenserum bzw. Hyperimmunserum während der ersten Lebenstage war unbefriedigend (14).

In den letzten Jahren sind verstärkte Anstrengungen unternommen worden, einen Schutz der hochempfänglichen Ferkel durch passiven Immuntransfer nach Vakzination der Muttersau zu erreichen (6, 8, 15, 19, 31). Dabei haben die Ergebnisse zahlreicher Versuche jedoch gezeigt, daß sowohl die Verwendung attenuierter Lebendimpfstoffe als auch von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern weder nach parenteraler (7) noch nach oraler (9) oder intramammärer Applikation (13, 19, 28) befriedigend war. Eine Ausnahme stellt der in Ungarn eingesetzte CKp-Stamm dar, der einen guten passiven Immunschutz verleihen soll. Leider fehlen bei den Arbeiten Testinfektionen unter standardisierten Bedingungen mit einem bekannten, virulenten Virusstamm (5, 12, 20).

In der vorliegenden Arbeit werden Vakzinierungsversuche mit dem über 300 Passagen in Schweineschilddrüsenzellkulturen attenuierten TGE-Virusstamm Bl beschrieben (3, 16), der bei geringer Pathogenität für das Ferkel (17) gute immunogene Eigenschaften aufweist (2).

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten durchgeführt.

## Material und Methoden

### *Virus*

Als Impfmateriale diente die 300. Passage des TGE-Virusstammes Bl (Bl-300). Die Züchtung erfolgte in sekundären Schweineschilddrüsenzellkulturen. Das Antigen wurde in lyophilisiertem Zustand bei + 4 °C gelagert und je nach Bedarf kurz vor Verwendung mit sterilem Aqua dest. rekonstituiert. Der Infektiositätstiter des Impfmateriale betrug nach Lösung je nach Charge zwischen  $2 \times 10^6$  und  $2 \times 10^7$  PFU/ml.

### *Virusneutralisations- und Plaquereduktionsteste*

Die Durchführung von Neutralisationstesten mit Serum-, Kolostrum- und Milchproben sowie Plaquereduktionstesten mit gelchromatographisch aufgetrennten Kolostrum- und Milchproben zur Antikörperbestimmung erfolgte nach bereits beschriebenen Methoden (4, 2).

### *Gelchromatographie*

Zur Bestimmung der Antikörperklassen wurden Kolostrum- und Milchproben von geimpften Sauen nach Vorbehandlung mit Hilfe der Gelchromatographie über eine Sephadex G 200-Säule (100 cm lang,  $\phi$  2,6 cm) durch Elution mit 0,1 M Trispuffer (0,2 M NaCl; pH 8,0) aufgetrennt (2). Die Bestimmung der optischen Dichte der einzelnen Eluatfraktionen erfolgte bei 280 nm (Uvicord, Fa. LKB, Bromma, Schweden).

In ausgewählten Fraktionen wurden mit Fc-spezifischen Antiseren gegen IgA, IgM und IgG vom Schwein (Fa. Nordic, Tilburg-Berchem, Belgien) mit Hilfe der Immunelektrophorese die Immunglobulinklassen bestimmt sowie der spezifische Antikörpergehalt gegen TGE-Virus im Plaquereduktionstest quantitativ ermittelt. Die verwendeten Techniken sind bereits in einer früheren Arbeit beschrieben worden (2).

### *Immunisierung der Sauen*

Insgesamt standen 16 trächtige Sauen (Deutsches Hybridschwein), vorwiegend Jungsauen, zur Verfügung. Alle Sauen waren vor Versuchsbeginn frei von TGE-Virusantikörpern. 15 Sauen wurden zweimal, etwa 5 Wochen und 2 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin, immunisiert, eine Sau diente als Kontrolle.

In Gruppe I (8 Sauen) erfolgte die Applikation auf oralem Wege. Dazu wurden jeweils 4 ml des Impfvirus in säurestabile Gelatine kapseln (Fa. Pohl-Boskamp Hohenlockstedt, Bundesrepublik Deutschland) abgefüllt, die den Sauen mit einem Pillengeber verabreicht wurden. Die 4 Sauen der Gruppe II bekamen jeweils die Hälfte Impfstoff (2 ml) auf oralem Wege in Kapseln und nasal durch Einträufeln verabreicht. Bei 2 Sauen (Gruppe III) erfolgte die Impfung in Kapseln mit lyophilisiertem Impfmateriale in Pulverform. Der Impfstoff war unschädlich für die Sauen. Klinische Symptome wurden nicht beobachtet.

Um Vergleiche zu ermöglichen, wurde eine Sau mit einem im Handel erhältlichen TGE-Impfstoff nach Angaben des Herstellers (Diamond Laboratories, Des Moines, USA) parenteral immunisiert.

Von allen Sauen erfolgte die Entnahme von Blutproben zur Antikörperbestimmung jeweils am Tag der Immunisierung, der Geburt und am 3., 7. bzw. 14. Tag post partum. Ferner wurden Kolostrumproben sowie Milch am 3., 7. und 14. Tag post partum gewonnen. Als Kolostrum wurde die Milch bis zu 12 Stunden nach der Geburt angesehen.

Tabelle 1

Titer neutralisierender Antikörper gegen TGE-Virus in Serum, Kolostrum und Milch von Sauen nach 2maliger Immunisierung sowie Seren von Ferkeln bis zu 14 Tagen post partum und die Zahl der überlebenden Ferkel 11 Tage nach der Testinfektion

Gruppe	Sau Nr.		rezipr. Antikörpertiter* Tage post part				Zahl der Ferkel / Übert.
			Geburt	3 dpp	7 dpp	14 dpp	
Gruppe I	S - 15	Sauenserum	8	16	32	64	4 / 4
		Milch	128	64	16	32	
		Ferkelseren	<1	8 - 32	16 - 32	8 - 16	
	S - 22	Sauenserum	16	16	8	156	11 / 7
		Milch	32	8	8	32	
		Ferkelseren	<1	2 - 8	2 - 16	2 - 16	
	S - 23	Sauenserum	32	32	64	128	10 / 10
		Milch	128	64	32	16	
		Ferkelseren	<1	16 - 128	8 - 128	16 - 64	
	S - 25	Sauenserum	32	64	64	64	11 / 11
		Milch	128	64	32	32	
		Ferkelseren	<1	16 - 128	16 - 64	4 - 32	
	S - 26	Sauenserum	4	4	4	64	6 / 5
		Milch	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	
		Ferkelseren	<1	1 - 4	2 - 4	8 - 64	
	S - 39	Sauenserum	16	16	32	256	8 / 7
		Milch	32	16	16	8	
		Ferkelseren	<1	2 - 32	8 - 32	32 - 128	
	S - 42	Sauenserum	2	2	16	256	6 / 4
		Milch	<2	2	2	128	
		Ferkelseren	<1	2	2 - 32	4 - 256	
S - 44	Sauenserum	64	64	>256	16	7 / 7	
	Milch	32	32	64	64		
	Ferkelseren	<1	16 - 256	128 - 256	8 - 16		
Gruppe II	S - 17	Sauenserum	16	16	64	32	5 / 5
		Milch	32	16	8	8	
		Ferkelseren	<1	16 - 32	4 - 32	4 - 32	
	S - 29	Sauenserum	32	32	128	256	7 / 6
		Milch	64	32	16	16	
		Ferkelseren	<1	16 - 64	2 - 64	128 - 256	
	S - 33	Sauenserum	128	256	128	128	9 / 9
		Milch	16	64	128	128	
		Ferkelseren	<1	256 - 512	128 - 256	16 - 128	
	S - 35	Sauenserum	16	16	64	64	3 / 3
		Milch	32	16	16	8	
		Ferkelseren	1	16 - 32	4 - 16	8 - 32	
Gruppe III	S - 21	Sauenserum	2	4	512	256	9 / 5
		Milch	8	n. u.	32	64	
		Ferkelseren	<1	2 - 4	2 - 8	8 - 64	
	S - 27	Sauenserum	4	4	2	64	5 / 2
		Milch	16	4	2	32	
		Ferkelseren	<1	2 - 4	2	32 - 64	
Parenter. Immunisier.	S - 43	Sauenserum	64	64	256	256	10 / 1
		Milch	256	32	8	8	
		Ferkelseren	<1	16 - 512	32 - 256	16	
Kontrolle	S - 45	Sauenserum	<1	<1	<1	128	6 / 0
		Milch	<1	<1	<1	64	
		Ferkelseren	<1	<1	-	-	

\* Ein Titer von 1 bedeutet vollständige Neutralisation durch unverdünntes Serum  
n. u. = nicht untersucht

*Testinfektion der Ferkel*

Die Testinfektion aller Ferkel erfolgte am 3. Lebenstage mit dem virulenten TGE-Virusstamm Miller<sup>2</sup>. Die Ferkel von Sau Nr. 25 und Sau Nr. 33 wurden zusätzlich am 5. bzw. 10. Lebenstag testinfiziert. Für die Infektion der Ferkel diente eine Darmverreibung eines mit dem Miller-Stamm infizierten Ferkels (5. Ferkelpassage nach Isolierung). Pro Ferkel wurde 1 ml einer Verdünnung oral verabreicht, die 100—500 letale Dosen Virus enthielten.

Als Kontrolle wurden Ferkel einer nicht geimpften Muttersau der gleichen Testinfektion unterzogen.

Für die Bestimmung der Serumantikörpertiter erfolgten Blutentnahmen am 3., 7., und 14. Lebenstag der Ferkel.

**Ergebnisse***Antikörperbildung*

3 Wochen nach der ersten Immunisierung lagen die Serumantikörpertiter der Sauen von Gruppe I und II zwischen 1 : 2 und 1 : 32, die der Tiere von Gruppe III betragen 1 : 2 und 1 : 4. Nur zwei Sauen (S-33 und S-35) der Gruppe I und II zeigten nach der ersten Immunisierung keine Serokonversion. Die parenteral immunisierte Sau 43 hatte 3 Wochen nach der Erstimpfung einen TGE-Virus-Antikörpertiter von 1 : 2.

Die Ergebnisse des *Antikörpernachweises im Serum* der immunisierten Sauen nach der Geburt sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Sauen bildeten Serumantikörper, deren Titerhöhe zum Zeitpunkt der Geburt jedoch individuell unterschiedlich war. Je nach Sau schwankten die Titer zwischen 1 : 2 und 1 : 128. Die Höhe der Antikörpertiter blieb bis zum 7. Tag p. inf. relativ konstant, 14 Tage p. inf. ließ sich bei den meisten der geimpften Sauen ein mit der Testinfektion der Ferkel im Zusammenhang stehender, mehr oder weniger deutlicher Serumentiteranstieg beobachten. Lediglich bei vier Sauen (S-17, S-25, S-33, S-44) trat dieser Boostereffekt nicht ein.

Tabelle 2

TGE-Antikörpertiter\* der isolierten Immunglobulinklassen in Kolostrum und Milch von oral und oronasal immunisierten Sauen und Überlebensrate der Ferkel

Gruppe	Sau Nr.	Kolostrum		Milch 3 dpp		Milch 7 dpp		Milch 14 dpp		Zahl der Ferkel / Überl.
		IgA / M	IgG	IgA / M	IgG	IgA / M	IgG	IgA / M	IgG	
Gruppe I	S - 15	16	9	n. u.	n. u.	18	12	120	128	4 / 4
	S - 22	7	20	n. u.	n. u.	3	< 1**	n. u.	n. u.	11 / 7
	S - 23	34	44	n. u.	n. u.	4	2	7	1	10 / 10
	S - 25	4	4	n. u.	n. u.	16	10	n. u.	n. u.	11 / 11
	S - 39	13	15	4	5	1	1	18	20	8 / 7
	S - 44	13	10	4	1	28	1	35	7	7 / 7
Gruppe II	S - 17	32	64	n. u.	n. u.	10	2	8	1	5 / 5
	S - 29	4	8	6	1	8	1	10	11	7 / 6
	S - 33	n. u.	n. u.	30	18	15	2	8	1	9 / 9
	S - 35	4	5	1	2	1	1	n. u.	n. u.	3 / 3
	S - 43	< 1	3	< 1	2	< 1	< 1	2	1	10 / 1

\* reziproke Werte

\*\* ein Titer von 1 bedeutet vollständige Neutralisation durch unverdünntes Eluat

n. u. = nicht untersucht

<sup>2</sup> Für die Überlassung des Stammes danken wir Prof. Dr. M. PENSART, Gent, sehr herzlich.

Zwischen den oral (Gruppe I) und oronasal (Gruppe II) immunisierten Sauen waren Unterschiede in der Antikörperentwicklung nicht feststellbar. Auffällig sind jedoch die niedrigen Antikörpertiter der mit nicht rekonstituiertem, lyophilisiertem Impfstoff vakzinieren Tiere der Gruppe III sowie der relativ hohe Titer der mit einem im Handel erhältlichen Impfstoff parenteral geimpften Sau (S-43).

In der Regel lagen die *Antikörpertiter im Kolostrum* etwa zwei bis vierfach höher als die Serumantikörpertiter der einzelnen Sauen. Die *Milchantikörpertiter* sanken bis zum 14. Tag post partum kontinuierlich ab. Sie waren generell wesentlich niedriger als die Kolostrumantikörper (Tabelle 1). Nur bei einigen Sauen der Gruppen I und II (S-33, S-42) führte die Reinfektion nach Testinfektion der Ferkel auch zu einem gleichzeitigen Anstieg des Antikörpertiters in der Milch, während bei beiden Tieren der Gruppe III (S-21, S-27) ein deutlicher Boostereffekt bei den Milchantikörpern eintrat.

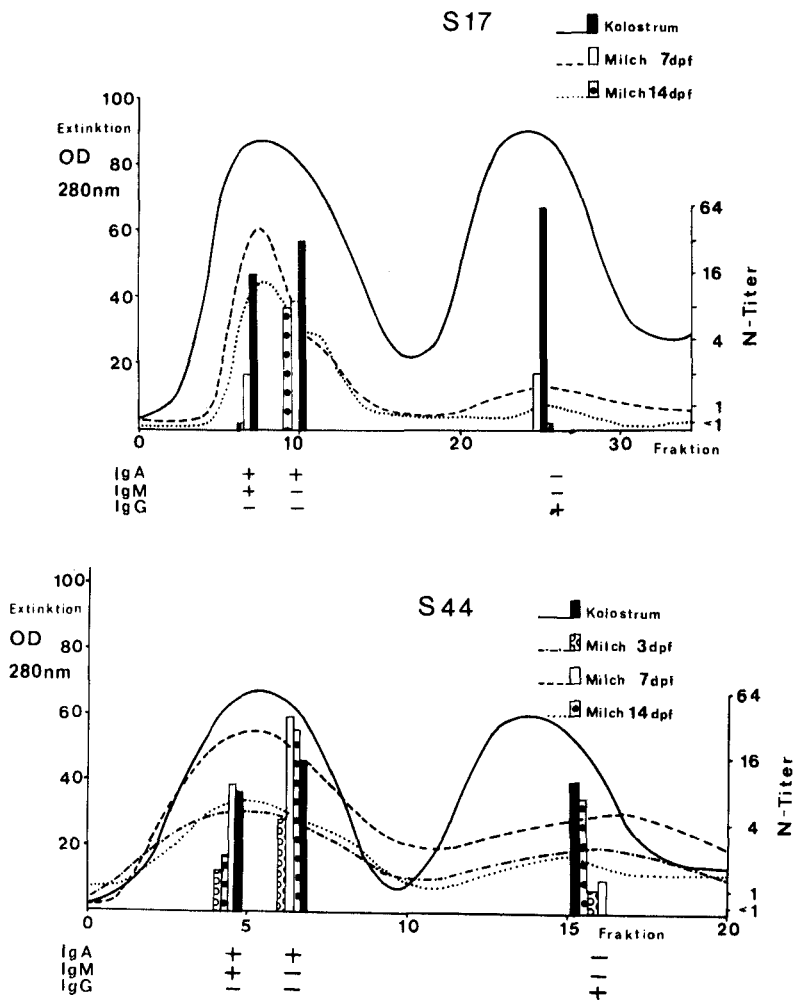


Abb. 1 a/b. Auftrennung und Nachweis von TGE Virusantikörpern in Kolostrum sowie Milch 3, 7 und 14 Tage post festum von oral (S 44) und oronasal (S 17) mit TGE Bl 300-Virus immunisierten Sauen

Der *Serumantikörperspiegel der Ferkel* korreliert meist mit dem der Sauenmilch. Am 14. Lebenstag ist jedoch häufig ein, wenn auch geringer, Antikörperanstieg bei den Ferkeln auf Grund der Testinfektion zu beobachten. Bei keinem der in den Versuchen verwendeten Ferkel konnten vor Kolostrumaufnahme Serumantikörper festgestellt werden (Tabelle 1).

#### *Immunglobulinklassen in Kolostrum und Milch*

In Abbildung 1 a und b sind charakteristische Extinktionskurven nach säulenchromatographischer Trennung von Kolostrum und Milch mit Sephadex G 200 dargestellt. Mit Hilfe der Immunelektrophorese ließ sich nachweisen, daß im aufsteigenden Teil des ersten Peaks hauptsächlich IgM-Antikörper zu finden sind, ausnahmsweise auch geringe Mengen IgA, während der absteigende Teil oder die Schulter dieses Gipfels ausschließlich IgA enthält. Im zweiten Peak des Chromatogramms sind immer IgG-Antikörper dargestellt.

In der Regel entspricht bei allen Proben der IgA-Titer mindestens dem IgG-Titer, häufig ist der IgA-Anteil höher.

Die Höhe der spezifischen TGE-Virusantikörpertiter in den einzelnen Immunglobulinklassen unterlag ebenso wie die Titer der Gesamtmilchproben starken Variationen. Die individuellen Werte sind in Tabelle 2 dargestellt. Im Kolostrum lagen die Antikörpertiter der IgA-Fraktionen der Gruppen I und II zwischen 1 : 4 und 1 : 34, die der IgG-Fraktion schwankten von 1 : 4 bis 1 : 64.

7 Tage post partum betragen die entsprechenden Werte für IgA/M zwischen 1 : 1 (uv) und 1 : 28 sowie für IgG zwischen < 1 und 1 : 12.

11 Tage nach der Testinfektion der Ferkel ließ sich aufgrund einer Kontaktinfektion in den IgA/M-Fraktionen in der Regel ein Titeranstieg feststellen. Bei einem Teil der Sauen kamen auch Titeranstiege im IgG-Bereich vor.

Die mit der kommerziell erhältlichen TGE-Vakzine immunisierte Sau 43 wies im Gesamtkolostrum einen sehr hohen Antikörpertiter von 1 : 256 auf, er sank jedoch innerhalb von 7 Tagen auf 1 : 8. Die Auftrennung der Immunglobuline zeigte, daß diese Antikörper ausschließlich der IgG-Klasse angehörten.

Bei der nicht immunisierten, als Kontrolle dienenden Sau 45 waren im Kolostrum sowie in den 3- und 7-Tage-Milchproben keine TGE-Virusantikörper nachweisbar, 11 Tage nach der Testinfektion der Ferkel war in der Milch ein IgA-Titer von 1 : 25 und ein IgG-Titer von 1 : 20 nachweisbar.

#### *Morbidität und Mortalität der Ferkel nach der Testinfektion*

Nach der Testinfektion mit dem virulenten TGE-Virusstamm Miller entwickelten die meisten der in den Gruppen I und II oral bzw. oronasal geimpften 87 Ferkel aus 12 Würfen mittelgradige Durchfallerscheinungen. Schwere Erkrankungen wurden in 5 Würfen (S-22, S-26, S-29, S-39, S-42) beobachtet. Dabei war bei diesen Ferkeln die Inkubationszeit auf 3—4 Tage verlängert, im Vergleich zu 1 bis 2 Tagen nach Infektion der Ferkel einer nichtgeimpften Sau (S-45). Nach erneuter Testinfektion der Ferkel von S-25 und S-33 am 5. und 10. Lebenstag blieben die Ferkel jedoch gesund. Von 63 in Gruppe I (orale Immunisierung) verwendeten Ferkeln überlebten 55 (87 %), von 24 Ferkeln der Gruppe II (oronasale Immunisierung) überstanden 23 (96 %) die Infektion. Das ergibt eine durchschnittliche Überlebensrate von 90 % bei 87 Ferkeln.

Unbefriedigend war der passive Immunschutz, der nach Verimpfung von Lyophilisat in Pulverform (Gruppe III) erzielt wurde. In dieser Gruppe zeigten alle 14 Ferkel aus zwei Würfen mittelgradigen bis schweren Durch-

fall und 7 Ferkel starben zwischen 5 und 7 Tagen nach der Testinfektion (50 %).

Die parenterale Verabreichung einer kommerziell erhältlichen Vakzine (S-43) resultierte nach der Testinfektion in schweren Durchfällen aller 10 Ferkel. Nur ein Tier überlebte die Testinfektion, 9 Ferkel starben 4—6 Tage p. inf.

### Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wird gezeigt, daß mit zweimaliger oraler Immunisierung von trächtigen Sauen eine Prophylaxe gegen die TGE beim Ferkel durch passiven Immuntransfer möglich ist. Die Schutzrate liegt nach Testinfektionen unter Standardbedingungen bei etwa 90 % und ist damit deutlich höher als bei anderen Impfstoffen, die — auf verschiedenen Wegen appliziert — in einigen Ländern zur Bekämpfung der TGE eingesetzt werden. In Arbeiten von LEOPOLDT und Mitarbeitern (18), STEPANEK und Mitarbeitern (24) sowie nach Anwendung des in Ungarn entwickelten, ebenfalls oral applizierten CKp-Impfstoffes (20) wird zwar über einen deutlichen Rückgang der Mortalität nach Immunisierung der Sau berichtet, ein direkter Vergleich ist jedoch nur mit der parenteral verabreichten, kommerziell in den USA erhältlichen, attenuierten Vakzine möglich, da nur diese unter standardisierten Versuchsbedingungen geprüft worden ist. Mit dieser Vakzine waren etwa 45—55 % der Ferkel geschützt (7).

Für die hier nach oraler Immunisierung von Sauen erzielte hohe Schutzrate sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen. Einmal muß genügend Impfvirus den Dünndarm erreichen. Dazu ist wegen der relativen Säurelabilität des TGE-Virus (16) eine Applikation in säurefesten Kapseln unumgänglich. Diese orale Kapselapplikation stellt einen Nachteil dar, und eine zweimalige Immunisierung unter Praxisbedingungen ist dadurch mit einem erheblichen Aufwand verbunden.

Zum anderen muß sich das Impfvirus in einem möglichst großen Abschnitt des Dünndarmes der Sau vermehren, damit eine optimale IgA-Stimulierung erreicht werden kann (8). Die als Impfstoff eingesetzte 300. Zellkulturpassage des TGE-Stammes Bl erfüllt diese Forderung und besitzt auch gute immunisierende Eigenschaften (2, 3, 17).

IgA-Antikörper scheinen eine dominierende Rolle beim passiven Immuntransfer für die TGE deshalb zu spielen, weil sie über einen längeren Zeitraum von der Sau ausgeschieden werden (8, 10, 11) und gegenüber proteolytischer Spaltung resistenter sind als IgG (26). Diese Hypothese wird in den vorliegenden Untersuchungen dadurch bestätigt, daß bei der parenteral immunisierten Sau 43, die nur IgG-Antikörper gegen TGE mit Kolostrum und 3 Tage-Milch ausschied, nach der Testinfektion nur eins von 10 Ferkeln überlebte. Im Widerspruch hierzu stehen kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von STONE und Mitarbeitern (25), die mit isolierten IgG-, IgA und IgM-Fraktionen mit hohem Antikörpergehalt gegen TGE-Virus arbeiteten und bei TGE-Testinfektionen die höchste Überlebensrate nach der Verfütterung von IgG beobachteten. Da bei diesen Untersuchungen jedoch unberücksichtigt blieb, daß möglicherweise auch beim Schwein, ähnlich wie beim Menschen, IgA-produzierende Plasmazellen mit Kolostrum sowie Milch ausgeschieden und damit vom Säugling aufgenommen werden (30), ist es denkbar, daß unter natürlichen Bedingungen weitere Faktoren beim passiven Immuntransfer beteiligt sind.

Für die Kolostrum- und Milchantikörperstimulierung ist es unbedeutend, ob die Sauen oral oder kombiniert oronasal immunisiert werden. Der Impfstoff muß jedoch in flüssiger Form appliziert werden. Offenbar führt eine

Kapselapplikation von TGE-Viruslyophilisat in Pulverform nur zu ungenügender Aktivierung von Plasmazellen im Dünndarm. Über eventuelle Ursachen kann nur spekuliert werden, es ist aber vorstellbar, daß das Lyophilisat im Duodenum nur unvollständig gelöst wird und das Virus sich nur in einem kleinen Teilstück des Jejunums vermehrt.

Das Auftreten von Durchfall bei der Mehrzahl der Ferkel nach der Testinfektion zeigt, daß eine Schutzwirkung mit der BI-Vakzine vorerst nur gegen die hohe Mortalität erreicht werden kann. Hier sind sicher noch Verbesserungen, besonders im Hinblick auf die Erhöhung des Titers des Impfvirus möglich.

Schließlich bleibt noch die Frage zu diskutieren, inwieweit sich der TGE-Virusstamm BI von anderen attenuierten Stämmen in Bezug auf seine immunogenen Eigenschaften unterscheidet. Vergleichsuntersuchungen fehlen, jedoch scheint der BI-Stamm eine besonders hohe Virulenz aufzuweisen, die während der Zellkulturattenuierung nur langsam verlorengeht. Das Virus war erst nach 300 Passagen soweit attenuiert, daß Ferkel nach Infektion nicht mehr erkrankten (17). Im Gegensatz dazu verloren die Stämme SH, Miller und Purdue ihre krankmachenden Eigenschaften für Ferkel schon nach etwa 120 Passagen in Schweinenierenzellkulturen (1, 21, 23). Der ungarische CKp-Stamm, der ebenfalls über Schweinenierenzellkulturen isoliert und adaptiert worden war, benötigte nur etwa 35 Passagen zur Virulenzabschwächung (12). Möglicherweise ergeben sich auch Unterschiede durch die Attenuierung des Stammes BI in Schilddrüsenzellkulturen im Gegensatz zu Nierenzellkulturen, da die Wahl der Zellkultur auf die Proteinstruktur des Virus — und damit auf seine antigenetische Zusammensetzung — Einfluß hat (22).

Die Versuche sind unter Laborbedingungen durchgeführt worden. Inwieweit das günstige Bild durch unter Praxisbedingungen auftretende, exogene und endogene Faktoren beeinflusst wird, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Dabei werden auch zwei Probleme, einmal die Herstellung des Impfstoffes in schwer züchtbaren Schilddrüsenzellkulturen vom Schwein, zum anderen die bisherige Applikation mit Hilfe eines Pilleneingebers, zu lösen sein, die einer industriellen Produktion und einer breiten Anwendung noch im Wege stehen.

### Zusammenfassung

Mit dem über 300 Passagen in Schilddrüsenzellkulturen vom Schwein attenuierten TGE-Virusstamm BI wurden 14 trächtige Sauen zweimal etwa 5 Wochen und 2 Wochen vor dem Geburtstermin oral und oronasal immunisiert. Die orale Applikation des Impfstoffes erfolgte in säurefesten Kapseln; alle Sauen bildeten TGE-Virusantikörper in Serum, Kolostrum und Milch. Die Auftrennung der Immunglobuline von Kolostrum und Milchproben ergab, daß nach Immunisierung ein hoher IgA-Anteil in der Gammaglobulinfraktion stimuliert wird.

Nach Aufnahme von Kolostrum und Milch von Sauen, die mit flüssigem Virusmaterial in Kapseln oral oder oronasal immunisiert worden waren, waren 90 % der Ferkel (78 von 87 Tieren) gegen eine Testinfektion mit 100—500 LD<sub>50</sub> des TGE-Virusstammes Miller geschützt. Die meisten Ferkel zeigten lediglich schwachen bis mittelgradigen Durchfall nach der Testinfektion.

In den Würfen mit Todesfällen waren stärkere Erkrankungen die Regel. Nach oraler Kapselapplikation von Viruslyophilisat in Pulverform betrug die Schutzrate nur 50 % (7 von 14 Ferkeln). Von der zu Vergleichszwecken mit



einer kommerziellen Vakzine parenteral immunisierten Sau überlebte nur eins von 10 Ferkeln nach Testinfektion.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf eine Verwendung des Stammes Bl als Lebendimpfstoff für die Bekämpfung der TGE diskutiert.

### Summary

#### Attempts to develop an immunoprophylaxis against Transmissible Gastroenteritis (TGE) in pigs III. Passive immune transfer after oral vaccination with the attenuated TGE virus strain Bl

Using the TGE virus strain Bl that had been attenuated during 300 passages in porcine thyroid cell cultures 14 pregnant sows were orally and oronasally immunized twice — 5 and 2 weeks before parturition. The application of the vaccine was carried out in acid-stable capsules. All sows developed antibodies against TGE virus in serum, colostrum and milk. The separation of immunoglobulins in colostrum and milk showed that high IgA levels are stimulated in the gammaglobulin fraction after immunization.

After intake of colostrum and milk from sows, which were immunized orally and oronasally with fluid virus material in capsules, 90 % of the piglets (78 out of 87 animals) were protected against a challenge infection with 100—500 LD<sub>50</sub>. Most of the piglets showed diarrhea after challenge.

Only in litters with fatal cases was a profuse diarrhea observed regularly. After oral capsule application of viral lyophilisate in powder form the protection rate was only 50 % (7 out of 14 piglets). Only one of ten piglets from a sow immunized parenterally with a commercially available vaccine for comparative reasons survived the challenge.

The results are discussed with respect to the use of strain Bl as live vaccine in the control of TGE.

### Résumé

#### Développement d'une immunoprophylaxie contre la gastroentérite transmissible du porc (TGE)

#### III. Immunotransfert passif après vaccination de truies gestantes par voie orale avec la souche TGE atténuée Bl

En utilisant la souche TGE Bl, qui avait été atténuée par 300 passages en cultures de cellules de la thyroïde porcine, 14 truies gestantes étaient immunisées par voie orale et oronasale environ 5 et 2 semaines avant la date de naissance. Le vaccin était appliqué en capsules inattaquables par les acides; toutes les truies développaient des anticorps anti-TGE dans le sérum, le colostrum et le lait. Après immunisation et séparation des immunoglobulines colostrales et lactiques une fraction importante de l'IgA était retrouvée dans les gammaglobulines.

Protection contre une infection expérimentale avec 100—500 unités LD<sub>50</sub> de la souche TGE Miller a été obtenue en 90 % (78 de 87 animaux) des porcelets qui avaient reçu du colostrum et du lait provenant des truies immunisées par voie orale ou oronasale (suspension virale encapsulée). Après infection, la plupart des porcelets ne montrait qu'une diarrhée faible ou moyenne. Des signes cliniques plus sévères étaient observés dans les portées avec mortalité.

Une protection de seulement 50 % (7 sur 14 porcelets) était constatée après application du virus lyophilisé en capsules par voie orale. Dans le but de comparaison une truie avait été immunisée avec un vaccin commercial par

voie parentérale; seul un porcelet sur dix animaux infectés était protégé contre une infection expérimentale.

Les résultats de ces expériences sont discutés par rapport à l'utilisation de la souche Bl comme vaccin vivant contre la TGE.

## Resumen

### Desarrollo de una inmunoprofilaxis contra la gastroenteritis transmisible del cerdo (TGE)

#### III. Inmunotransferencia pasiva tras vacunación oral de cerdas preñadas con la TGE atenuada Bl

Utilizando la cepa virósica TGE Bl, atenuada por medio de 300 pasajes en cultivos de células tiroideas porcinas, se inmunizaron 14 cerdas gestantes 5 y 2 semanas antes de la fecha del parto por vía oral y oronasal. La vacuna fué aplicada en cápsulas ácidosresistentes; todas las cerdas formaban anticuerpos anti-TGE en el suero sanguíneo, calostro y leche. Después de inmunización y separación de las inmunoglobulinas calostrales y lácticas se apreció una fracción importante de IgA en las gammaglobulinas.

Se lograba protección en el 90 % de los lechones (78 de 87 animales) contra una infección experimental con 100—500 unidades DL<sub>50</sub> de la cepa TGE Miller si aquellos habían recibido calostro y leche proveniente de cerdas inmunizadas por vía oral u oronasal (suspensión virósica encapsulada). Después de una infección experimental, la mayoría de los lechones no mostró más que una diarrea insignificante.

En las camadas con casos mortales se observaron signos clínicos más graves.

Una protección del 50 % nada más (7 de 14 lechones) se evidenció después de aplicar virus liofilizado en cápsulas por vía oral. Con el objeto de comparación, se inmunizó una cerda por vía parenteral con una vacuna comercial; solo un lechón entre diez sobrevivió la infección experimental.

Los resultados se discuten en relación con la posibilidad de utilizar la cepa Bl como vacuna viva en la lucha contra la TGE.

## Literaturverzeichnis

1. ABOU-YOUSSEFF, M. H., und M. RISTIC, 1975: Protective effect of immunoglobulin in serum and milk of sows exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Canad. J. comp. Med.* 35, 41—45.
2. BACHMANN, P. A., und R. G. HESS, 1978: Versuche zur Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine. II. Immunogenität des Stammes Bl im Verlauf von Serienpassagen. *Zbl. Vet. Med. B*, 25, 52—61.
3. BACHMANN, P. A., und R. G. HESS, 1978: Orale Vakzinierung gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine. *Beihefte Zbl. Vet. Med.* 28, 187—191.
4. BACHMANN, P. A., T. HÄNICHEN, K. DANNER und B. BIBRACK, 1972: Zur Epidemiologie der Übertragbaren Gastroenteritis (TGE) beim Schwein. *Zbl. Vet. Med. B* 18, 166—174.
5. BENYEDA, J., und E. MOCSARI, 1974: Application of an attenuated virus containing TGE vaccine, the relationship of antibody level and immunity. *Developments in Biol. Standardization* 26, 33—37.
6. BAY, W. W., L. P. DOYLE und D. M. HUTCHINGS, 1953: Transmissible Gastroenteritis of swine — a study of immunity. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 122, 200—202.
7. BOHL, E. H., G. T. FREDERICK und L. J. SAIF, 1975: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Amer. J. Vet. Res.* 36, 267—271.
8. BOHL, E. H., R. K. P. GUPTA, L. W. MCCLOSKEY und L. J. SAIF, 1972: Immunology of transmissible gastroenteritis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 160, 543—549.

9. BOHL, E. H., and L. J. SAIF, 1975: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.* 11, 23—32.
10. BOURNE, F. J., 1969: IgA immunoglobulin from porcine milk. *Biochem. Biophys. Acta* 181, 485—487.
11. CORBEL, M. J., M. LUCAS und S. F. CARTWRIGHT, 1972: Immunoglobulin class in relation to neutralization of transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.* 90, 658—659.
12. CSONTOS, L., TH. SZENT-IVANYI und J. BENYEDA, 1973: Vaccination experiments against transmissible gastroenteritis (TGE) of swine. *Acta Vet. Acad. Sci. hung.* 24, 111—124.
13. DJURICKOVIC, S., und J. THORSEN, 1970: Experimental immunization of sows against transmissible gastroenteritis. *Vet. Rec.* 87, 62—64.
14. ESKILDSEN, M., 1971: Examination of field material with a view to isolating transmissible gastroenteritis virus in Denmark and experimental testing of prophylactic immune serum treatment. *Bull. Off. int. Epiz.* 76, 119—121.
15. FULLER, D. A., 1966: TGE of swine — II. Clinical field trials with an inactivated tissue culture vaccine. *Vet. Med.* 61, 257—260.
16. HESS, R. G., und P. A. BACHMANN, 1976: In vitro differentiation and pH sensitivity of field and cell culture-attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.* 13, 1642—1646.
17. HESS, R. G., P. A. BACHMANN und T. HÄNICHEN, 1977: Versuche zur Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine. I. Pathogenität des Stammes Bl im Verlauf von Serienpassagen. *Zbl. Vet. Med. B*, 24, 753—763.
18. LEOPOLDT, D., H. LIEBERMANN, G. ZAGRODNIK, E. SOBANSKI, M. FRITZSCH und H. HAHN, 1975: Der Verlauf der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) der Schweine in einer großen Ferkelproduktionsanlage vor und nach dem Einsatz der Riemser TGE-Vakzine. *Mh. Vet. Med.* 30, 646—649.
19. LUCAS, M. H., S. F. CARTWRIGHT und M. J. CORBEL, 1974: Attempts to vaccinate sows against TGE. *Developments in Biol. Standardization* 26, 38—40.
20. MOCSARI, E., J. BENYEDA und E. SAGHY, 1975: Vaccination experiments against transmissible gastroenteritis (TGE) of swine. *Acta Vet. Acad. Sci. hung.* 25, 37—45.
21. PENSART, M., 1976: Pathogenese und Immunität bei der Transmissiblen Gastroenteritis der Schweine. *Tierärztl. Umschau* 31, 535—542.
22. PIKE, B. V., und D. G. GARWES, 1977: Lipids of transmissible gastroenteritis virus and their relation to those of two different host cells. *J. gen. Virol.* 34, 531—535.
23. SHEFFY, B. E., 1965: Characterization of transmissible gastroenteritis virus. *Proc. Ann. Meet. US Livestock Sanit. Ass.* 69, 351—363.
24. STEPANEK, J., J. MENSİK, Z. POSPISIL und E. MESAROS, 1971: Immunity of sows against transmissible gastroenteritis of pigs. *Acta Vet. Brno, Suppl.* 2, 69—74.
25. STONE, S. S., L. J. KEMENY, R. D. WOODS und M. T. JENSEN, 1977: Efficacy of isolated colostral IgA, IgG and IgM (A) to protect neonatal pigs against the coronavirus of transmissible gastroenteritis. *Amer. J. Vet. Res.* 38, 1285—1288.
26. STONE, S. S., M. P. PHILLIPS und L. J. KEMENY, 1976: The effect of proteolytic enzymes on transmissible gastroenteritis immunoglobulins IgA, IgG, IgM isolated from porcine colostrum. *Proc. 4th Congress Internat. Pig Veterinary Society, Ames, Iowa, USA.*
27. TAMOGLIA, T. W., 1972: Present status of products available for use against transmissible gastroenteritis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 160, 554—558.
28. THORSEN, J., und S. DJURICKOVIC, 1970: Experimental immunization of sows with cell cultured TGE virus. *Can. J. comp. Med.* 34, 177—180.
29. THORSEN, J., und S. DJURICKOVIC, 1971: Experimental immunization of sows with inactivated transmissible gastroenteritis (TGE) virus. *Can. J. comp. Med.* 35, 99—102.
30. WALKER, W. A., 1975: Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics* 57, 901—916.
31. WELTER, C. J., E. LAUN und H. HEAD, 1966: Transmissible gastroenteritis of swine: properties of a vaccine and immunologic aspects in the sow and pig. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 149, 1587—1590.

Adresse der Autoren: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Fachbereich Tiermedizin, Veterinärstraße 13, 8000 München 22, Bundesrepublik Deutschland.