

# 斑點免疫吸附試驗應用於雞住血原蟲性白冠病之診斷

吳義興\* 陳素貞 張惟茗

台灣省家畜衛生試驗所生物研究系

**摘要** 斑點免疫吸附試驗 (DIA) 應用於雞住血原蟲病 (Leucocytozoonosis) 血清抗体之測定，其效果相當令人滿意。在本試驗中，60 個人工感染耐過雞血清樣品均呈陽性反應，敏感性較之瓊脂凝膠沉降試驗 (AGP) 為佳，而其特異性亦不輸後者。在野外雞場之應用，其敏感性亦較 AGP 試驗為高。但本試驗應用於測定感染雞血清中之可溶性抗原，則效果不理想。

**關鍵詞：**雞住血原蟲，血清學診斷，斑點免疫吸附試驗

## 緒言

1972 年 Morii<sup>[12]</sup> 發現雞感染 *L. caulleryi* 後第 10~15 天，血清中含有可溶性抗原，感染後第 17 天起，血清中之可溶性抗原消失而出現此抗原之抗体，此種血清中之抗原及抗体可以瓊脂凝膠沉降試驗 (Agar gel precipitation test, AGP test) 測出。此開拓了雞住血原蟲性白冠病血清學診斷之新頁。在其後有各種血清學診斷方法之報告，包括反相免疫電泳法<sup>[4]</sup>，直接及間接螢光抗体法<sup>[5, 9]</sup> 及酵素標示免疫吸附試驗 (ELISA)<sup>[10]</sup> 等，其中以 ELISA 法最敏感及最俱特異性。但 ELISA 試驗亦有缺點，其使用之 96 孔聚乙烯平盤對抗原之吸附性低且不穩定，因此測定之陽性界限值不容易統一，加上必需使用昂貴之判讀機，使此種診斷法在臨床上之應用受到很大之限制。Pappas 等<sup>[13]</sup> 以硝化賽璐珞紙 (Nitrocellulose paper) 取代平盤，並使用不溶性之基質，稱為斑點免疫吸附試驗 (Dot immunosorbent assay, DIA)，應用於利什曼體病 (Leishmaniasis) 之診斷，結果效果極佳，其後很多疾病亦試用此法作診斷，效果均甚滿意<sup>[1, 2, 11]</sup>。本試驗即試以 DIA 法應用於住血原蟲性白冠病之診斷。

## 材料與方法

### 可溶性抗原之製備：

在無特定病原 (SPF) 雞舍中飼養一年以上之白色來亨蛋雞 5 隻，各靜脈內注射住血原蟲之孢子蟲 2000 隻，於人工感染後第 15 天，血清中可溶性抗原達最高時，放血分離血清。收集之含抗原血清以 0.15 M pH 7.2 之磷酸鹽緩衝液 (Phosphate buffer saline, PBS) 稀釋 2 倍後，攪拌中緩緩加入飽和硫酸銨溶液，使其最後濃度為 45%，繼續攪拌 2 小時後，以 1500 g 離心 20 分鐘後去上液，沉澱物 45% 硫酸銨溶液再洗，攪拌後再離心，沉澱物以 40% 硫酸液再洗一次，最後沉澱以少量之 PBS 溶解後，放入透析膜中，在 4 °C 以 0.01 M PBS 透析 2 天，每天換液 2 次，最後收集之液即為粗製抗原液。使用分光光度計測蛋白含量，波長使用 280 nm，依吸光度 (OD) 為 1.0 時約等於 0.74 mg/ml 計算其蛋白質含量<sup>[6]</sup>。

### 血清抗体之製備：

另 10 隻 SPF 雞各人工感染住血原蟲之孢子蟲 1000 隻，待第 23 天後，血清產生抗体後，採血分離血清，以 AGP 試驗測定，取其較高力價者依上述硫酸銨處理法純化其免疫球蛋白。

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

**抗原之純化：**

參考 Pharmacia<sup>[14]</sup> 與 Hudson & Hay<sup>[6]</sup> 之方法。以 CNB ractivated sepharose 4 B (Pharmacia) 膠粒 10 g，以 1 mM HCl 洗 2 次後，再以含 0.5 M NaCl 之 0.1 M carbo-bicarbonate buffer (pH 9.0) (CBB) 洗 2 次，懸於 100 ml 之 CBB 液中，加入純化之免疫球蛋白 200 mg，在室溫中輕輕混合 2 小時，放入含 1.0  $\mu$  濾紙之過濾器中，以陰壓去液後，加入阻斷液（每 1 升含 Tris base 12.1 g, NaCl 29.22 g, Glycine 15.01 g, pH 8.0），室溫中 2 小時後，再以陰壓去液，以含 0.5 M NaCl 之 Acetate buffer (0.1 M pH 4.0) 及 CBB 液交替洗 5 次，最後把膠粒懸於 CBB 液中即為結合免疫球蛋白之膠粒，把此種膠粒填入層析管柱 (30×1 cm)，以膠柱體積約 2 倍量之 CBB 液沖流，粗製原液 15 ml 離心去雜質後，緩緩加入管柱，待抗原液全部進入膠柱後，關閉管柱出口，使抗原液結合約 1 小時，管柱出口接分劃分析儀後，開啓管柱出口，加 0.15 M PBS 入管沖洗，至以波長 280 nm 測定無蛋白質為止，改以 100 ml 之 0.1 M Glycine buffer (pH 2.8) 沖洗，收集有波峰之蛋白質流出液，立刻加 10 % Tris 液調 pH 7.0 以上，以防蛋白質變性。收集液放入半透膜中，以 PEG 60,000 (Merk) 濃縮。

**抗原蛋白質含量之測定：**

依照 Bradford<sup>[3]</sup> 之方法。抗原液以 2 倍稀釋後，取 0.1 ml 加入 5 ml 稀釋色素液 (Bio-Rad)，混合後以分光光度，波長 595 nm 測定其 OD 值。依標準蛋白質濃度與其 OD 值之直線回歸圖計算其濃度。

**血清樣品之採集：**

6 月齡來亨蛋雞各靜脈內接種雞住血原蟲孢子蟲 100 隻，接種後第 21 到 25 天之血液抹片檢查，至少一次血液中證實有配子細胞之雞 60 隻，於感染後第 40 天分別採血，分離血清，作為測定用陽性雞血清樣品。另採取 66 個 SPF 雞血清樣品為陰性對照。為 DIA 試驗野外應用測試用，以經實驗室血液檢查及病理檢查，證實為污染住血原蟲病之雞場，採取雞血清樣品 300 個，另未曾發生過本病之雞場血清樣品 100 個供用。人工感染雞孢子蟲之 6 月齡來亨蛋雞 32 隻，於感染後第 12 天間分別採血，供測血清中可溶性抗原用。

**斑點免疫吸附試驗之測定：**

參考 Heberling & Kalter<sup>[8]</sup>, Hamdman & Jarris<sup>[7]</sup> 之方法施行。硝化賽璐洛紙 (nitrocellulose paper, NC 紙) 剪成約 7.5×5.5 cm 之方塊，以 PBS 潤濕後放入壓紙盒中，以真空吸乾後，每一孔點入抗原液各 10  $\mu$ l，放室溫 30 分鐘後，浸入阻斷液（5 % 脫脂奶粉，0.01 % antifoam, 0.0001 % methiolate 於 0.01 M PBS）1 小時，取出後以 PBS 略洗後加上 5  $\mu$ l 待測血清，置密封盒放 37 °C 1 小時，以含 0.05 % Tween 20 之 PBS 洗 3~4 次，加上稀釋之標示抗體液，於 37 °C 1 小時，取出以含 0.05 % Tween 20 之 PBS 洗 3~4 次，浸入作用液（0.05 % Diamino benzidine, 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 滴），室溫中 1~5 分鐘後水洗即可。

**斑點免疫吸附試驗之評估：**

人工感染陽性及陰性血清分別以斑點免疫吸附試驗及免疫擴散試驗測定，比較其敏感性及特异性。野外本病例陽性雞場血清及未發生過本病場血清，亦分別以斑點免疫吸附試驗及免疫擴散試驗測定，並評估其敏感性及特异性。

**瓊脂凝膠沉降試驗：**

依 Morii<sup>[12]</sup> 之方法，於含 2 % 凝膠之測定孔各添加抗原液或抗血清 0.05 ml 後，放室溫密封盒中，72 小時後判定。

**斑點免疫吸附測定感染未發病雞血清中之可溶性抗原：**

其操作方式與一般斑點免疫吸附試驗相似，但 NC 紙首先與雞抗住血原蟲免疫球蛋白液結合，再放入待測血清，清洗後加住血原蟲免疫血清，最後加上標示抗體及作用液。

**結 果****抗原之純化：**

為取得純化之抗原液以供血清學診斷用，把含可溶性抗原之雞血清，先以硫酸銨處理及透析後而作粗製抗原液。此種粗製抗原液使用親和性層析法，作進一步之純化。把粗製抗原液置入已結合有抗體之 CNBr-sepharose 4 B 管柱中，作用 1 小時，先以 PBS 沖洗出管柱中未結合之粗製抗原液後，管柱再以 0.1 M Glycine buffer (pH 2.8) 沖提液沖洗出結合在管柱中之抗原液。其析出之圖譜

如圖 1，圖中第 1~10 管為未結合之粗製抗原液，第 19 管加入沖提液後，第 23~27 管為流出之純化抗原液。收集之抗原液立刻以 Tris buffer 中和使其 pH 上升到 7.0~8.0，以防蛋白質變性。

**抗原濃度之測定：**

純化之抗原液以 Bradford<sup>[3]</sup> 之法測定結果，其蛋白濃度為 215 µg/ml，經調整濃度使其為 200 µg/ml。為瞭解最適宜之抗原濃度，抗原液以 2 倍系列稀釋後，每一 NC 紙各行之格分別加 10 µl，每一列格則各加 2 倍系列稀釋之陽性血清，作棋盤式測定，標示抗体使用 1：500 稀釋液。其結果顯示抗原以稀釋 1：40 (5 µg/ml) 最適宜，即每一格各加 50 ng 時，陰性血清不會有非特異性反應出現，而其敏感性最高。含抗体之血清以 1：10 到 1：20 稀釋使用可得明顯之呈色。

**雞住血原蟲病抗体血清之測定：**

人工感染雞住血原蟲耐過後之雞血清樣品 60 個，無感染本病之 SPF 雞血清樣品 66 個，別以 DIA 法及 AGP 試驗作測定，前者使用 1：20

之稀釋血清，後者使用血清原液。其結果如表 1，人工感染耐過雞血清以 DIA 試驗測定結果全部陽性 (60/60)，而 SPF 雞血清則全部陰性 (66/66)，其敏感性及特異性均達 100%。使用 AGP 試驗時，耐過雞有 2 個樣品測不出 (敏感性 97%)，但 SPF 雞則全部為陰性 (特異性 100%)。以野外污染住血原蟲病雞場雞血清樣品 300 個及未曾發生過本病之雞場血清樣品 100 個，分別以 DIA 試驗及 AGP 試驗作測定，其結果如表 2，健康雞場之雞血清樣品均為陰性，住血原蟲病污染雞場之雞血清，以 DIA 試驗測定時，94% (283/300) 雞血清均可測出血清抗体，但以 AGP 試驗則僅 88% (265/300) 可測出血清抗体之存在。

**人工感染雞血清可溶性抗原之測定：**

人工感染雞住血原蟲之雞，經 12 天採集之血清樣品 32 個，以斑點免疫吸附試驗 (DIA) 及免疫擴散試驗 (AGP) 測定血清中之抗原，結果 DIA 試驗 25 (78.1%) 個呈陽性反應，而 AGP 試驗有 19 (59.4%) 個呈陽性。

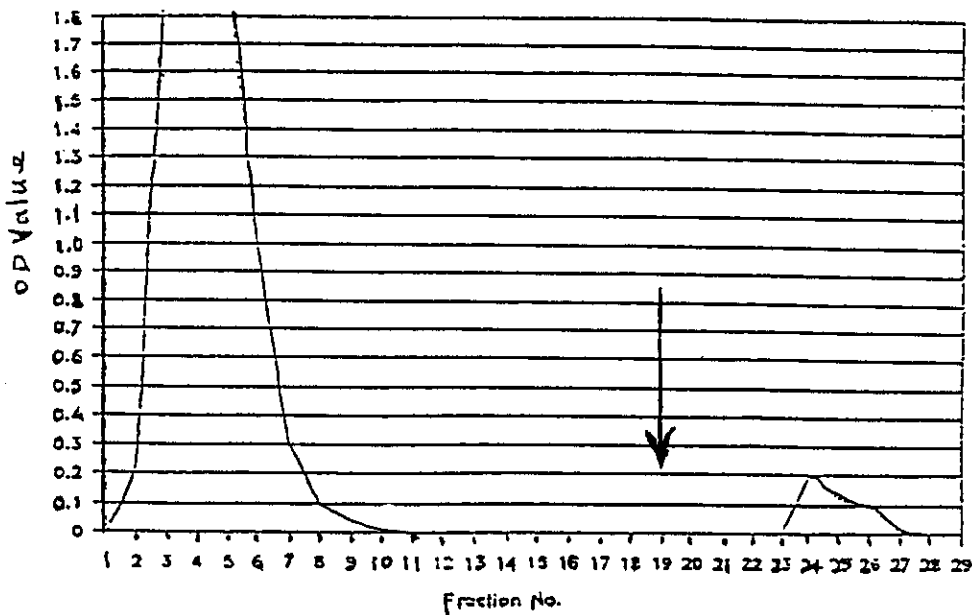


圖 1 純化抗原液之親和性層析析出圖。1~10 管為未結合抗原液，19 管加入沖提液，23~27 管為純化抗原液。

表 1 雞住血原蟲病人工感染耐過雞及 SPF 雞之血清學測定

血清樣品 來源	樣品 數量	DIA 試 驗			AGP 試 驗		
		陽 性	陰 性	合 計	陽 性	陰 性	合 計
耐 過 雞	60	60	0	60	58	2	60
SPF 雞	66	0	66	66	0	66	66

註：DIA：斑點免疫吸附試驗，血清 1：20 測定。

AGP：免疫擴散試驗，血清原液測定。

表 2 雞住血原蟲病污染雞場及未曾發病雞場之雞血清學測定

血清樣品 來源	血 清 樣 品 數 量	DIA 試 驗			AGP 試 驗		
		陽 性	陰 性	合 計	陽 性	陰 性	合 計
污染雞場	300	283	17	300	265	35	300
健康雞場	100	0	100	100	0	100	100

註：DIA：斑點免疫吸附試驗，血清 1：20 測定。

AGP：免疫擴散試驗，血清原液測定。

## 討 論

斑點免疫吸附試驗 (DIA) 是一種很方便之試驗，它不需要昂貴之酵素反應判讀機，更不必為判讀 OD 標準值之不統一而煩惱，因它可以肉眼呈色作判定。DIA 試驗主要之需求為高純度之抗原液。在本試驗中，使用親和性層析法純化抗原液，結果效果相當令人滿意，雖然每次產量不多，但因 DIA 試驗抗原使用量很小，每次測定僅需 50 ng，而且親和性層析法純化用之管柱可反覆利用，多次之操作累積則可達臨床應用量。

在本次試驗中，以 DIA 試驗測定人工感染雞住血原蟲病耐過雞血清，及發生過本病雞場之雞血清，其敏感性結果分別為 100% 及 94%，均極令人滿意，6% 雞場雞血清呈陰性，可能是感染時間不一致，當採血時，其血清中抗体尚未出現的結果。對同時使用之 AGP 試驗，人工感染耐過雞有 3%，發生過本病雞場雞血清有 12% 未呈陽性，其敏感性不佳之原因，可能是 AGP 試驗

需血清中抗体達到相當之力價，才能產生反應，而某些特異體質之宿主，其抗体之產生較差，或產生之抗體力價不高，再加上採血時間之偏差而造成約 1 成之為陰性。

雞住血原蟲病若能在其發病前診斷出，則可能以投藥控制本病之發生，由於本病感染後約在第 15~16 天突然發病死亡，在發病前數天，其血清中出現可溶性抗原，因此若能測定出血清中之抗原，則可在發病前診斷其是否感染。在本次試驗中，測定結果效果不佳，僅約 78.1% 可測出，其原因可能是可溶性抗原之產生因個體之差異，僅部份雞隻能產生高量之可溶性抗原於循環血液中，因此雖使用 SPF 雞人工感染，亦未能在感染第 13 天時測出其血清中之可溶性抗原，此種差異實際情形尚待進一步之調查。另一種可能原因，為 96 孔盤鋪底用之免疫球蛋白敏感性及特異性尚有待加強，此有待進一步製作單源抗体，或能提高 DIA 之可溶性抗原檢出率。

## 參考文獻

1. Afshar A, Wright PF, Dulec GC. Dot-enzyme immunoassay for visual detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *J Clin Microbiol* 23 : 563 – 567, 1986
2. Batra HV, Chand P, Ganju L, Mukherjee R, Sadana JR. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies in bovine brucellosis. *Res Vet sci.* 46 : 143 – 146, 1989
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitative of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248 – 254, 1976
4. Fujisaki K, Takamatsu H, Kitaoka S, Suzuki K, Kuniyasu C. Rapid detection by counterimmunoelectrophoresis of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with Leucocytozoon caulleryi. *Nat Inst Anim Hlth Quart* 20 : 96 – 100, 1980
5. Fujisaki K, Takamatsu H, Kitaoka S, Suzuki K, Kamio T. Direct immunofluorescent staining of Leucocytozoon caulleryi of different developmental stages. *Nat Inst Anim Hlth Quart* 21 : 73 – 79, 1981
6. Hudson L, Hay FC. *Practical immunology*. 2nd. ed. Blackwell Scientific Publication LTD. Australia. 1980
7. Hamdman E, HM Jarvis. 1985. Nitrocellulose-based assays for detection of glycolipid and other antigen: Mechanism of binding to nitrocellulose. *J Immuno Methods* 83 : 113 – 123, 1980
8. Herbrink RL, Kalter SS. Rapid dot-immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. *J Clin Microbiol* 23 : 109 – 113, 1986
9. Isobe T, Akiba K. Indirect immunofluorescent antibody test in chicken Leucocytozoonosis. *Nat Inst Anim Hlth Quart* 22 : 163 – 169, 1982
10. Isobe T, Suzuki K. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibody to Leucocytozoon caulleryi. *Avian Path* 15 : 199 – 212, 1986
11. Kumar S, Band AH, Samantaray JC, Dang N, Talwar GP. A dot enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Entamoeba histolytica. *J Immuno Methods* 83 : 125 – 133, 1985
12. Morii T. Presence of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with Akiba caulleryi. *Nat Inst Anim Hlth Quart* 12 : 161 – 167, 1972
13. Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. DOT – ELIZA : A micro technique for the rapid diagnosis of visceral Leishmaniasis. *J Immunol Methods* 64 : 205 – 214, 1983
14. Pharmacia Fine Chemicals. *Affinity chromatography principles and methods*. Sweden. 1979

## Dot Immunosorbent Assay for Leucocytozoonosis Diagnosis

Y. S. Wu\*, S. J. Chen, and W. M. Chang

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.

**SUMMARY** The result of Dot immnosorbent assay (DIA) applied on detecting serum anitbodies to Leucocytozoonosis was satisfied. In this study, the whole sixty sera of artificially infected chickens showed positive reaction, the sensitivity and the specificity of the test was better than that of Agar gel pricipitation test (AGP). In field test, the sensitivity of DIA also showed well. The rate of DIA for detection of serum soluble antigen of Leucocyto zoonosis was about 78.1 %, which was unsatisfied as diagnostic method.

**Key words:** *Leucocytozoon, Serologic diagnosis, Dot immunosorbent assay*

---

\*Corresponding author