

# 豬附紅血球立克次體病診斷用酵素 結合免疫吸附法之開發

57-8

劉敏主<sup>1</sup> 蘇杰夫<sup>1</sup> 劉培柏<sup>1</sup> 徐興鎔<sup>2</sup> 沈永紹<sup>3</sup>

台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

以摘脾豬隻人工接種 *Eperythrozoon suis*，於病原體血症高峯期，收集高度病原感染紅血球，製作 ELISA，IHA 及 IFA 抗原，並建立適當試驗組合，結果 ELISA 法敏感性高，可做為大量檢體之篩選。

豬附紅血球立克次體病為 *Eperythrozoon suis* 病原體所感染，引起豬隻發燒、貧血等一連串之臨床症狀，易被忽略之感染經過，而引起很大之經濟損失<sup>(2)</sup>；然而自然感染之下，病原體在末梢血流中出現之期間相當短，不易察覺<sup>(3)</sup>，而因本病斃死豬隻以貧血為主徵，就臨床病理學而言，無特殊性病理變化能作確診<sup>(1)</sup>，若有其他合併感染，將使疫情更加複雜化，致忽略本病之存在；因此血清學診斷用抗原之開發與利用，成為診斷本病必然需要之工具<sup>(4,5,6,7,8)</sup>，故擬定本計劃，以開發操作方便快捷；便宜、敏感性高，易於大量篩選之 ELISA 試驗法<sup>(5)</sup>，俾使對本病防治上有所助益。

## 材料與方法

### (一)試驗材料：

#### 1. 供試病原株：

係分所分離保存株，經接種摘脾豬隻，俟病原體出現時，採取感染血液，加等量之 20% 甘油 Alserver 液，然後分裝於 2 ml 種毒瓶中，置 -70°C 保存備用。

#### 2. 供試豬隻：8~12 週齡小豬(台糖公司購入)

#### 3. 供試化學藥品：

goat anti swine IgG peroxidase ( Jackson )

goat anti swine IgG Fluorescein conjugate ( Jackson )

glutaraldehyde ( Sigma )

#### 4. 供試血清：

SPF 豬血清 ( 養豬研究所分讓 )

人工感染豬血清

受檢豬血清 ( 野外豬場 )

#### 5. GTE ( Glutaraldehyde-treated erythrocyte ) 採取 SPF 豬血液，EDTA 抗凝，依照 IHA 抗原製作法步驟處理之健豬紅血球。

### (二)試驗方法：

#### 1. 病原增殖：

購入 8~12 週齡小豬，經麻醉，脾臟摘除，並以復健約 7~8 日，將分離保存之 *Eperythrozoon suis*，以靜脈注射人工接種摘脾材料豬，並逐日驗血及臨床觀察，於本病極期，病原體血症高峯期採

1. 台灣省家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所  
2. 台糖公司畜產研究所  
3. 國立台灣大學獸醫學系

血，Alserver's 抗凝，4℃冰箱中保存備用。

## 2.各種血清反應法：

### (A)酵素結合免疫吸附法(ELISA)：

依 Lang<sup>(5)</sup> 之方法製作抗原，即將上述本病極期，病原體血症高峰期採取之高度病原感染血液，由4℃冰箱中取出，經PBS PH7.2 600 xg, 10分遠心洗滌三次，棄上清液及白血球層；紅血球以PBS回復為原來體積，加二倍量蒸餾水，使紅血球溶血後，再加五倍濃度之PBS適量，使恢復等張，再以1000 xg, 遠心10分鐘，棄上清液，沉澱物以PBS適量稀釋，置-70℃中保存備用。

使用時取出抗原溶解後，10,000 xg 離心30分，於 checkerboard titration 求出最適抗原濃度，以碳酸緩衝液(0.05M Bicarbonate buffer pH9.6)稀釋，每孔100 μl 加入ELISA盤之96孔中，4℃隔夜吸附後，以洗滌液(0.05% Tween 20 PBS pH7.2; PBST)洗三次，吸乾，每孔以250 μl 填補液(0.5% Bovine serum albumin PBS; BSA-PBS)37℃填充1小時，再以PBST洗滌三次，吸乾；待測血清經GTE吸附後，以PBST稀釋為200 x, 每孔加100 μl, 置入37℃中感作1小時，以PBST洗三次，吸乾，加入以PBST適當稀釋之山羊抗豬IgG peroxidase conjugate, 每孔100 μl, 37℃感作1小時後，以PBST洗三次，吸乾，加入酵素受質液(100 ml citrate-phosphate buffer 含40 mg O-phenylenediamine, 100 μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，每孔100 μl, 室溫避光下，感作30分，每孔加入50 μl 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，於ELISA判讀機490 nm波長下判讀。

### (B)間接血球凝集試驗(IHA)：

抗原製作如下：先以人工感染摘脾

豬隻，病原體血症高峰期，頸靜脈採血10 ml, EDTA抗凝，600 xg 離心10分鐘，棄上清液及白血球層；紅血球以PBS回復為5%懸浮液，置於磁性攪拌器中，緩緩加入1ml 2.5% GA-PBS, 作用1小時，續加入1ml 2% BSA-PBS, 作用半小時，600 xg 離心10分鐘，棄上清液，紅血球以PBS洗三次，以0.04% NaN<sub>3</sub> PBS回復為5%懸浮液，置4℃中，保存備用。

IHA試驗時，待測血清先56℃30分非動化後取50 μl, 加50 μl 之10% GTE, 加0.9 ml 1% 健兔血清PBS, 室溫感作30分後，600 xg 離心10分，取上清液，即為20倍稀釋血清，再以0.1% gelatin PBS依序稀釋為40 x, 80 x; 抗原及GTE以PBS洗去NaN<sub>3</sub>, 以1% Rabbit serum PBS稀釋為0.5%懸浮液。

血清	20x	20x	40x	80x	(50 μl)
	+	+	+	+	
	GTE 抗原 抗原 抗原				(50 μl)

於V型96孔血清盤中，震盪均勻，置4℃中，6小時後判定。

### (C)間接螢光抗體法(IFA)：

據 Nicholls<sup>(6)</sup>, 本病極期，摘脾接種豬80%病原體血症期，頸靜脈採血，EDTA抗凝，以PBS遠心洗滌三次，棄血清、白血球、血小板，加入與遠心下來的紅血球等體積之1.75% BSA-PBS混合均勻，將其塗抹於螢光玻片上，製成薄層塗抹標本，經風乾後，以冷Acetone, 固定25分，取出快速吹乾，置玻片盒中，密封，零下70℃冰櫃中保存備用。

實驗時，抗原由-70℃中取出，置含濕盒中，使回復到室溫，滴入1:20稀釋待檢血清及已知陽性、陰性對照血清，置入含濕盒中，37℃30分感作後，以PBS水洗三次，每次5~10分，濾紙吸乾，滴入適當稀釋之山羊抗

豬 IgG 螢光標示抗體，置 37 °C 30 分鐘作後，再以 PBS 水洗三次，濾紙吸乾，以 70 % 甘油 PBS 當包埋液，蓋上玻片，螢光顯微鏡下鏡檢。

3. 測定抗體，測定各血清學抗體出現情形。

## 結 果

ELISA 試驗法，求得最佳組合為：抗原最佳濃度為蛋白質含量 0.03 mg / ml (圖 1)，最佳山羊抗豬 IgG peroxidase Conjugate 稀釋倍數為 8000 x (圖 2)，ELISA 陽性標準值，由 IHA, IFA 陰性血清，所測之 ELISA OD 值求其平均值加 2 倍標準偏差，結果為 0.222。

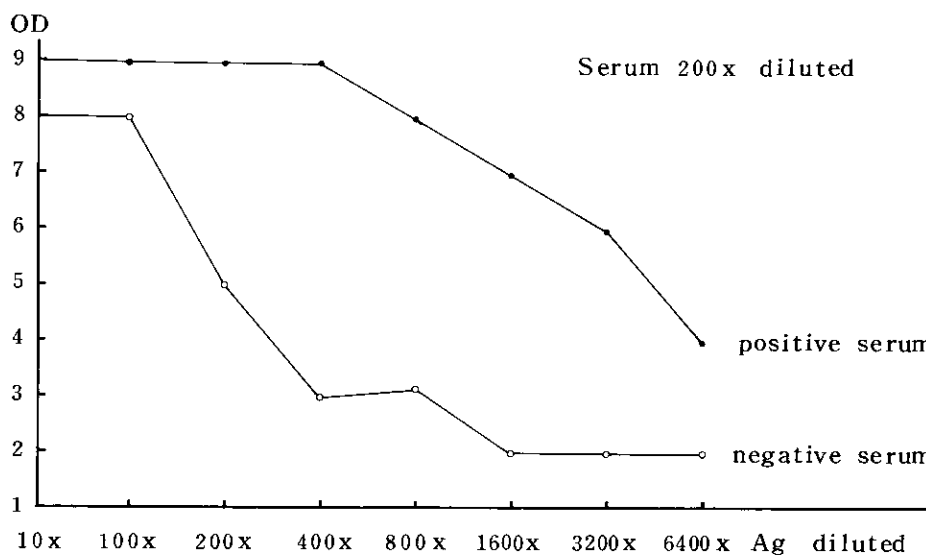
IHA 試驗：血清與 GTE 若無凝集者，則 20 x 以上與 抗原有凝集者為陽性，無凝集者為陰性；血清與 GTE 若有凝集者，則與抗原之凝集價需 4 倍於 GTE 之凝集價，才算為陽性。

*Eperythrozoon suis* 實驗室感染豬隻抗體，ELISA 抗體在豬隻病原體出現之同時，即測出抗體陽性，IHA 及 IFA 則稍慢 1 ~ 2 天 (表 1)。

## 討 論

本次實驗中，ELISA 抗原，屬粗製之半純化抗原，此種半純化抗原，敏感性雖高，然實無法避免非特異性，故受測血清，先用 GTE 加以吸附，以盡量減少非特異性，故建議將來還需在抗原純化上進一步努力。

IHA 抗原，採用高度病原感染之豬紅血球，直接以 glutaraldehyde 加以固定，作法極為方便，惟此種抗原，紅血球因無法控制每個血球上之病原體數量，故每次測定之穩定性不盡一致，每次製作之抗原，敏感度不盡相同，將來也需在純化抗原上努力，以製作更好之 IHA 抗原。



最佳抗原稀釋倍數為 1600 x，其蛋白質量為 0.03 mg / ml

圖 1 ELISA 試驗，*E. suis* 抗原濃度之選擇

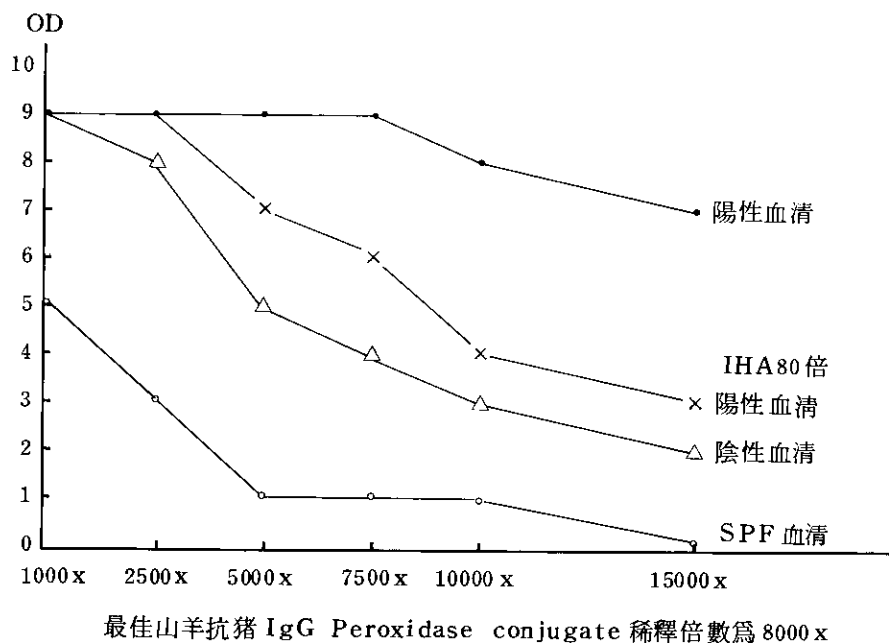


圖 2 ELISA 試驗，山羊抗豬 Ig G Peroxidase Conjugate 稀釋濃度之選擇

表 1 八週齡小豬人工接種 *E. suis* 感染血液 20 ml 後，體溫、病原感染血球及 ELISA, IHA, IFA 抗體

Day	Temperature °C	infected RBC %	ELISA OD	IHA	IFA
infected	39.3	—	0.09	—	—
1	39.3	—	0.11	—	—
2	39.4	—	0.06	—	—
3	39.5	—	0.13	—	—
4	39.1	—	0.12	—	—
5	39.2	—	0.10	—	—
6	39.6	—	0.14	—	—
7	39.4	—	0.229	—	—
8	39.6	1-2 %	0.351	40 x	—
9	39.8	1-5 %	0.413	80 x	40 x
10	40.0	5 %	0.583	160 x	40 x
11	39.6	2-5 %	0.714	320 x	160 x
12	39.3	—	0.789	640 x	> 160 x
13	39.0	—	0.924	5120 x	> 160 x
14	39.2	—	0.826	5120 x	> 160 x
15	39.6	—	0.831	5120 x	> 160 x

## 參 考 文 獻

1. 李維誠、王俊秀、劉正義、曾秋隆。  
1986。豬附紅血球立克次體病之自然感  
染病例與實驗室診斷。台灣畜牧獸醫學  
會會報。48: 39-46。
2. 徐興鎔、鍾文彬、胡大光、周癡元、謝  
文逸。1985。豬附紅血球立克次體病在  
台灣之發生及治療報告。中華民國獸醫  
學會雜誌。11: 211-220。
3. 曾智美。1988。豬附紅血球體對幼豬人  
工感染試驗。碩士論文。
4. Ilemobade, A.A. and Blotkamp, C.  
Serological diagnosis of Epery-  
throzon. ovis infection by the  
indirect. Immuno Flurescent anti-  
body test Tropertmed parasit 29:  
307-310.
5. Lang, F.M. Ferrier, G.R. Nicholls  
T.J. Detection of antibodies to  
Eperythrozon ovis by the use  
of an enzyme-liked immunosorb-  
ent assay. Research in vet. Sci.  
43: 252-1987.
6. Nicholls, I.J. and Veale. P.I. A  
modified indirect immunofluoresc-  
ent assay for the detection of  
antibody to Eperythrozon ovis in  
sheep., Aust. Vet. J. 63(5): 157-  
159. 1986.
7. Smith. A.R. An indirect Hemagg-  
lutinatin test for the diagmosi of  
Eperythrozon suis infection on  
swine. An. J. Vet. Res. 36(9):  
1319-1321. 1975.
8. Splitter, E.J. The complement-  
Fixation test in diagnosis of  
Eperythrozonosis in swine. J.A.A.  
M.A. 132: 47-49. 1958.

**Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for  
Detecting Eperythrozoon suis Antibody in Swine.**

M.C. Liu<sup>1</sup>, J.F. Su<sup>1</sup>, P.P. Liu<sup>1</sup>,  
Frank S. Hsu<sup>2</sup>, Y.S. Shien<sup>3</sup>.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health The Branch  
Institute of Animal Drugs Inspection

SUMMARY

The heavily parasitised red blood cell was collected from splenectomized piglet inoculated with E. suis at the peak of parasitaemia. The ELISA IHA and IFA test antigens were prepared and their optimum test system were established.

ELISA test was a appropriate screening method for large scale testings.

- 
1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health The Branch Institute of Animal Drugs Inspection Tansui, taiwan, R.O.C.
  2. Animal Industry Research Institute. T.S.C.
  3. Dept. Veterinary Medicime. National Taiwan University.