

牛白血病凝膠沉澱法抗原保存試驗 及在乳山羊之抗體調查

林文華 楊揚輝 李新進 陳素貞 蕭終融

台灣省家畜衛生試驗所

以牛白血病病毒持續感染FLK細胞之培養液，調製而成之瓊脂凝膠免疫擴散法抗原，經冷凍乾燥後保存於4℃、-20℃及-40℃下15個月，其敏感性、特異性均不受影響。

調查本省14個縣市7,855頭乳山羊血清，陽性率介於0%~11.5%，平均為1.5%(120/7,855)。有陽性例的縣市，最高是11.5%(台東縣)和11%(台北市)，其他七個縣市的陽性率皆很低，有五個縣市是陰性的。

牛白血病又稱為地方性牛白血病(Enzootic Bovine Leukosis, 簡稱EBL)，是由牛白血病病毒(Bovine Leukemia Virus, 簡稱BLV)所引起的淋巴組織腫瘤(Lymphosarcoma)性疾病。自從BLV被證明⁽¹⁰⁾後，已知因感染BLV動物的末端淋巴球會終生攜帶病毒並被視為BLV傳染源^(13,14)。而這些感染BLV的牛隻會產生BLV特異性的抗體，因此檢測血中之抗體是偵測BLV感染的最有效方法⁽⁶⁾。目前在血清學上，操作簡便，具實用性、特異性的，而被廣泛使用於田間從事抗體調查的方法是瓊脂凝膠免疫擴散法(Agar gel immuodiffusion test, 簡稱AGID)^(6,9)。

台灣地區乳牛之抗體調查其陽性率相當高從2%~39%⁽²⁾及0%~40.74%⁽³⁾。

牛白血病不但感染牛群，而且曾從羊分離到病毒，此病毒與牛白血病病毒在抗原上，形態學上及生物學性狀無差異，故被認為從牛所感染的⁽⁵⁾，而且楊等⁽³⁾對乳牛之抗體調查中亦初步對區域性之乳山羊做BLV抗體調查結果有0.84%(17/2028)之陽性率。故本試驗擬擴大調查範圍了解乳山羊對BLV之感染情形，同時對試製之凝膠沉澱用抗原進行冷凍乾燥，檢討其保存情形。

材料與方法

病 毒：

病毒係用Van Der Maaten等創立的BLV持續感染細胞(FLK/BLV)株，以添加5%初生牛血清與抗生素的細胞發育用MEM培養液，培養於37℃下經5~7日，收

集培養液做為製備抗原之用。

陽性血清：

含有 gp 及 p 兩種抗體之標準血清係由日本農林水產省家畜衛生試驗場分讓。

免疫擴散試驗用抗原之製備及其力價測定：

依照 Onuma⁽¹²⁾ 等之方法進行，並稍加修正，過程大概如下。將病毒培養液經 7,000 rpm 轉 30 分鐘離心後，上清液加入 0.1 M Binary ethyleimine (BEI) 使其最後濃度成爲 0.002 M，在 37°C 下作用 10 小時的不活化處理後，再加入同濃度之硫代硫酸鈉 (Na₂S₂O₃·5H₂O)，終止殘餘之 BEI 的作用。之後，每 100 ml 之不活化病毒液加入 30 gm 之硫酸銨鹽析，把其沉澱物用 PBS 做成浮游液，再以 PBS 透析後以聚二乙醇 6000 (PEG 6000) 強制濃縮至約原來的 1/150 量，作為凝膠沉澱法用的抗原，以進行乳山羊抗體的調查及抗原保存試驗。此抗原含有醣蛋白抗原 (gp 抗原) 與蛋白抗原 (p 抗原)。

將製備之抗原做 2 倍稀釋，除中央小孔滴入標準血清外，其他小孔滴入各稀釋倍數之抗原。以出現沉降線的最末稀釋濃度爲一單位來設定抗原單位。

凝膠沉澱法用抗原之保存：

將製備成的抗原，以標準血清調成最適力價 8 單位後，分裝於每小瓶子 1 ml，並分成二梯次作冷凍乾燥之後，分別保存於 4°C，-20°C 及 -40°C 下，每個月取出以蒸餾水溶解

後測定其抗原力價。

受檢血清：

由各縣市家畜疾病防治所，轉送 79 年度乳山羊布氏桿菌陰性反應之血清供檢之。

免疫擴散法試驗：

依照 Onuma 等⁽¹²⁾ 之方法實施。將配成的 0.8% Agarose 取 15 ml 置於直徑 9 cm 之塑膠培養皿做成平板瓊脂凝膠層，各培養皿用打孔器打出 8 組反應孔組。這些反應小孔係由中央 1 個，周圍 6 個，共 7 個小孔。其每一小孔之直徑爲 5 mm，各小孔之距離爲 3 mm 組成的一試驗組。每組中央小孔內滴入抗原，周圍 6 孔任選 2 個對稱小孔滴入陽性對照血清，其餘 4 孔滴入受檢的乳山羊血清。每小孔滴入之抗原或對照血清量均爲 0.03 ml，然後置入密閉箱內於室溫三天後判定之。

結 果

本實驗共得病毒培養液約 55,000 ml，分七次製備了凝膠沉澱法用抗原，經混合測定其力價調配爲 8 單位計得 370 ml。經冷凍乾燥後的抗原，分別保存於 4°C，-20°C 及 -40°C 下，於每個月取出測定其抗原力價之結果，二次不同冷凍乾燥後的抗原，在經過各種不同溫度保存至 15 個月，對於標準血清之作用均能保持原來 8 倍的抗原之力價 (如表 1)。

表 1 凝膠沉澱法用抗原之保存對抗原力價之影響

梯 次	保存溫度	冷 凍 乾 燥 前				冷 凍 乾 燥 後				冷 凍 乾 燥 後 15 個 月			
		×1	×2	×4	×8	×1	×2	×4	×8	×1	×2	×4	×8
第 一 次	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
第 二 次	4 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

本次進行對乳山羊感染牛白血病抗體之調查，共包括了台灣省 13 個縣市及台北市，總頭數有 7,855 頭，平均陽性率為 1.5% (120 / 7,855)。陽性率除了台東縣和台北市較高外，其餘有七個縣市是較低的，另外有五個縣市的乳山羊是抗體陰性的。(如表 2)

表 2 台灣地區乳山羊感染牛白血病之抗體調查

縣市別	送血清數	陽性反應數	陽性率 (%)
台北縣	1,343	4	0.3
宜蘭縣	427	2	0.7
新竹縣	198	0	0
台中縣	462	4	0.9
彰化縣	1,032	1	0.1
雲林縣	705	0	0
嘉義縣	488	4	0.8
高雄縣	734	0	0
屏東縣	623	0	0
台東縣	756	87	11.5
花蓮縣	512	4	0.8
嘉義市	167	1	0.6
台南市	299	0	0
台北市	109	12	11.0
合計	7,855	120	1.5

討 論

牛白血病病毒感染之牛在世界各國均被廣泛重視，尤其在防疫上隔離或淘汰抗體陽性牛的方法，都成為 BLV 淨化之基本條件。1981 年來，在歐洲^(7,8)，美洲^(10,11)及亞洲^(2,3,9,12) 做流行病學之調查，已有使用單價 gp 抗原或 gp 及 p 混合之抗原行免疫擴散法試驗。但是，由於牛白血病病毒含有 gp 及 p 兩種抗原，所以牛感染 BLV 後會出現 gp 及 p 兩種抗體^(11,12)，故利用單價之抗原作為檢驗感染 BLV 之指標，似乎並不理想，況且在本次乳山羊罹患 BLV 之檢驗，常可見到保有 gp 及 p 兩種抗體之病例，因此，本試驗配製之瓊脂

凝膠沉澱法抗原即含有此兩種抗原，其經冷凍乾燥保存至 15 個月，取出與日本標準血清作用，發現其特異性及敏感性仍均高，很適合於田間之感染乳山羊的檢驗。

依小山等⁽⁴⁾之報告，p 抗原之力價通常為 gp 抗原之兩倍，且相當安定，如使用高力價抗原時，對低力價抗體之檢查有所困難，而使用低力價抗原時，則其沉降線不明顯，而判定困難。又據王⁽¹⁾試驗得知以含有 gp 4 單位及 p 8 單位力價混合的抗原偵測 BLV 感染牛是最佳之抗原。因此本試驗配製之抗原係採用 8 單位力價的抗原，效果很好。並由保存試驗顯示二梯次不同冷凍乾燥之抗原，保存至 15 個月時均維持一致性的穩定性，抗原力價不受不同溫度之保存及不同梯次之冷凍乾燥的影響而有所變異。

本實驗對台灣地區進行乳山羊感染牛白血病毒之抗體的調查，其結果如表 2。除了新竹縣、雲林縣、高雄縣、屏東縣和台南市外，其餘各縣市均有陽性病例的發生，平均陽性率為 1.5% (120 / 7,855)，與楊等⁽³⁾對本病以六縣市作初步調查所得的陽性率 0.8% (17 / 2,028) 有略高，而且在 14 個縣市的 120 頭陽性乳山羊中，台東縣和台北市即佔有 99 頭是陽性總頭數的 82.5%，其餘縣市有陽性的是呈分散的，頭數不定。由以上顯示出本次調查的結果，陽性的乳山羊主要是分佈在台灣地區的東部及北部，使我們更進一步瞭解了台灣地區的乳山羊，污染了牛白血病的嚴重性及其疫情。

參 考 文 獻

1. 王焜辰、張政宏。1988。瓊脂凝膠免疫擴散法：牛白血病病毒抗原力價之評估。中華民國獸醫學會雜誌，14：101-112。
2. 張政宏、王焜辰。1984。牛白血病診斷抗原之試製及疫情調查。農委會 73 年研究報告。
3. 楊揚輝、吳義興、蕭終融、李新進、黃金城、廖述吉、李淑慧、張惟茗、邱仕炎。1987。牛白血病診斷液之研製及台

- 灣地區之疫情調查。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 23: 1-6。
4. 小山弘之、寶達勉、梶川治、椿志都、吉川博康、吉川堯、齊藤博。1981。寒天ゲル内免疫擴散法に用いる牛白血病ウイルス抗原の最適力價について。日獸會誌 34: 374-378。
 5. 大森常良、安藤敬太郎、石谷類造、稻葉右二、清水悠紀臣、林光昭、山内亮。1981。牛病學，近代出版。
 6. Burny, A., F. Bex, H. Chantrenne Y. Cleuter, D. Dekegel. J. Ghysd-ael, R. Kettmenn, M. Leclercq, J Leunen, M. Mammerickx and D. Portetille. 1979. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis, Adv. Cancer Res. 28: 251-311.
 7. De Vries, G. 1982. In Fourth Int. Symp. on Bovine Leukosis, Straub O.C., editor, Current Topics in Vet. Med. and Anim. Sci. 15:510-515.
 8. Flensburg, J.C. 1982. In Fourth Int. Symp. on Bovine Leukosis, Straub, O.C., editor, Current Topics in Vet. Med. and Anim. Sci., 15: 500-509.
 9. Honma, T., M. Onuma, T. Mikami 1980. Bovine leukemia virus infection in Japan: Antibody and virus detection in cattle. Jpn. J. Vet. Sci., 42: 5-8.
 10. Miller, J.M., L.D. Miller. C. Olson and K.G. Gillette. 1969. Virus like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 43: 1297-1305.
 11. Miller, J.M. and M.J. Van Der Maaten. 1979. Serologic detection of bovine leukemia virus infection Vet. Microbiol., 1: 195-202.
 12. Onuma, M., C. Olson, L.E. Baumgartener. 1975. J. Natl. Cancer Inst. 55: 1155-1158.
 13. Paul, P.S., K.A. Pomeroy, A.E. Castro, D.W. Johnson, C.C. Muscoplatt and D.K. Sorensen. 1977. Detection of bovine leukemia virus in B-lymphocytes by the syncytia induction assay. J. Natl. Cancer Inst., 59: 1269-1272.
 14. Paul, P.S., K.A. Pomeroy, D.W. Johnson. C.C. Muscoplatt, B.S. Handwerger F.F. Soper and D.K. Sorensen. 1977. Evidence for the replication of bovine leukemia virus in the B lymphocytes. amer J. Vet. Res., 38: 873-876.

**PRESERVATION OF THE ANTIGEN FOR DIAGNOSIS OF BOVINE
LEUKOSIS AND SEROLOGICAL SURVEY ON ANTIBODY
AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN MILK GOAT**

W.H. Lin, Y.H. Yang, S.J. Lee, S.C. Chen and J.R. Shiau

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Lyophilized antigen for the diagnosis of bovine leukosis in immunodiffusion test was extracted from FLK cells which had been infected with bovine leukemia virus. When the antigen was stored at 4°C, -20°C and -40°C for 15 months, its sensitivity and specificity remained unchanged.

Serological survey of serum sample obtained from milk goat in 14 geographical regions of Taiwan, 120 out of 7,855 were positive. The positive rates varied from 0% to 11.5% in different geographical regions with an average of 1.5%. The positive rates of 11.5% and 11% were the highest in the positive regions while those of the seven regions were very low. Another five regions gave a negative reaction.