

猪蘇拉病抗體IgG及IgM之液遞免疫反應

26-9

費昌勇¹ 廖述吉² 林文華²

1. 國立台灣大學獸醫學系
2. 台灣省家畜衛生試驗所

將發生於本省之 Trypanosoma evansi 接種於猪後取血清，經分離其 IgG 及 IgM 後與此錐蟲之可溶性抗原和蟲體抗原進行凝膠沉降試驗，與錐蟲之活體於試管內進行簇集反應；另將與上述抗體反應後之錐蟲進行小白鼠中和試驗。結果顯示：凝膠沉降反應以 IgG 為主，而簇集反應則以 IgM 為主，中和反應則以 IgM 為主。此外，螢光抗體反應顯示在感染兩週後即可自猪血清中測出。自錐蟲感染之小白鼠血漿中以硫酸銨抽取之可溶性抗原與 Triton-X 100 自純淨錐蟲抽取之結構性抗原，與 IgG 在凝膠沉降試驗中顯示二者為同一物質 (identical)。

前 言

蘇拉病是錐蟲病之一種，本省自光復後即發生，至今尚未撲滅。牛、猪、及家犬均有感染之報告^(2,3)，目前在本省仍十分普遍。據台大獸醫學系沈永紹教授之研究得知感染本病之家畜有免疫抑制現象^(4,5)。在其診斷方面，沈^(1,3)更建立了間接螢光診斷法及被動性血球凝集試驗法。周⁽⁶⁾亦建立粗抗原之 ELISA 測定法；此外，鄭⁽⁹⁾亦建立了凝膠沉降法。在國外，錐蟲之研究較偏重於睡眠病及 Leishmaniasis 方面，對於本省發生之蘇拉病研究的較少。在其他錐蟲方面之研究，在診斷方面有 ELISA 法，血溶比離心法，及快速免疫電泳法等報告^(15,22,24,26)。在免疫反應

方面，亦得知感染錐蟲之動物會因蟲體抗原之不斷變化而有迴歸性發熱現象^(12,14,20,23)。因此宿主對錐蟲之感染有十分複雜之免疫反應，本文則是自不同種類抗體對本蟲所產生之免疫反應進行研究。

材料與方法

錐蟲抗原之抽取及計數：

將台大獸醫學系，沈永紹教授實驗室分讓之 trypanosoma evansi 錐蟲注射小白鼠腹腔 3~5 天後，小白鼠血中即含有大量之錐蟲，抽血加 Alserver 溶液做抗凝劑，經 3000 rpm, 30 min 離心，取 Buffy coat 通過以緩衝液平衡之 DEAE cellulose，得不含血球之純蟲體懸浮液⁽¹⁷⁾。前述離心之上清液加硫

1. 國立台灣大學獸醫學系
2. 台灣省家畜衛生試驗所

酸鉍至 65% 之飽和後於 4 °C 攪拌一夜，次晨以 3000 rpm, 15 min 離心，沉澱以 PBS 透析，所得之溶液即為蟲體之可溶性抗原，其最終體積約為原液之 1/80⁽⁹⁾。另將純化之錐蟲蟲體以 Triton x-100 處理 18 小時後以 10,000 rpm, 60 min 離心取上清液得蟲體之結構性抗原。錐蟲之計數係將錐蟲懸浮液以 3% 醋酸稀釋後用一般之血球計算盤仿血球計算法計算⁽¹⁰⁾。

螢光抗體反應：

取每次接種免疫後兩週之猪血清進行間接螢光抗體反應，顯示接種感染後兩週即可以螢光抗體反應測出(圖 1)。本試驗未定量各階段之螢光抗體力價。



圖 1 錐蟲之螢光抗體圖，× 400。

錐蟲抗原之抽取與其凝膠沉降反應：

將自感染錐蟲之小白鼠血液，經純化處理後可得純淨之錐蟲體(圖 2)。將前述錐蟲之結構性抗原及可溶性抗原分別與陰性血清，錐



圖 2 經 DEAE cellulose 處理後之純淨錐蟲，× 1000。

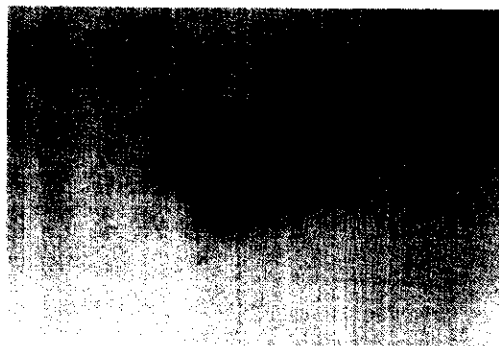


圖 3 錐蟲之結構性抗原(S)及可溶性抗原(S)對 IgG(G) 之凝膠沉降反應。

表 1 凝膠沉降反應與抗體種類之關係

抗體種類	結構性抗原	可溶性抗原
IgM	-	-
IgG	+	+
陽性血清	+	+
陰性血清	-	-

註：1. “+”及“-”分別表示發生及未發生凝膠沉降反應。

2. IgM, IgG 之濃度均為 20 mg/ml。

3. 血清為原液。

4. 兩種錐蟲抗原之粗蛋白質濃度為 10 mg/ml。

簇集反應：

將純化之 IgG, IgM 陰陽性血清分別以二倍稀釋，與純淨之錐蟲 50,000/ml 等體積混合，置室溫作用觀察兩種抗體對錐蟲簇集反應之效應。結果顯示僅 IgM 及陽性血清會造成錐蟲之簇集反應，及蟲體之嚴重變形(圖 4)，且反應有前區現象(prozone phenomenon)(表 2)。而 IgG 則不會造成錐蟲

之簇集反應，僅造成蟲體之靜止，在 400 倍光學顯微鏡下蟲體亦未見變形。至於陰性血清，則對蟲體無認何影響。

表 2 簇集反應與抗體種類及濃度之關係

抗體種類	抗體稀釋倍數					
	原液	2	4	8	16	32
IgM	++	+++	++	+	-	-
IgG	-	-	-	-	-	-
陽性血清	++	+	+	-	-	-
陰性血清	-	-	-	-	-	-

註：“+”表示發生簇集反應，反應程度以本符號之數目表示。

“-”表示未發生簇集反應。

IgM, IgG 原液之濃度均為 20mg/ml。

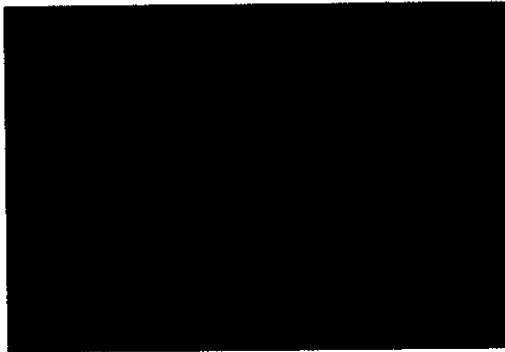


圖 4 經 IgM 抗體作用後發生簇集反應及嚴重變形之蟲體塊，×200

血清中和力價之小白鼠測定法：

將免疫豬之 IgG, IgM 陰陽性血清與純淨之錐蟲 50,000/ml 等體積混合，置 37 °C 作用 4 小時後於小白鼠腹腔接種，觀察一週，結果顯示於表 3 得知僅 IgM 對錐蟲有殺傷力。

表 3 中和反應與抗體種類之關係

抗體種類	小白鼠死亡情形		
	接種數	存活數	死亡數
IgM	5	5	0
IgG	5	0	5
陽性血清	5	0	5
陰性血清	5	0	5

註：1. IgM, IgG 之濃度均為 20 mg/ml，血清均為原液。

2. 本試驗死亡之小白鼠均在第三天死亡，未死亡之小白鼠經連續觀察十天仍未死亡。

討 論

本研究結果顯示凝膠沉降反應以 IgG 為主（表 1），而簇集反應則以 IgM 為主（表 2），中和反應則以 IgM 為主（表 3），螢光反應在感染兩週後即可測出。

感染錐蟲之動物血清中，IgM 之值均會異常升高，係一熟知之事實^(21,27)。在 Norris 及 Kierszenbaum 於 *T. cruzi* 之血清抗體研究均顯示加入補體方可造成蟲體之融解^(18,21)。本研究發現，在沒有補體存在下，IgM 仍可造成 *T. evansi* 錐蟲之簇集反應以及蟲體之嚴重變形及死亡（表 2、3；圖 5），此點與牛之反應相同。足見 IgM 在防疫上之重要性。此外，其前區現象之特性顯示此乃一純粹之抗體抗原反應。至於 IgG 雖亦可造成蟲體之靜止，但其殺傷力不如 IgM（表 3）。在蟲體之溶解方面，Norris 等在 *T. cruzi* 之研究發現可造成錐蟲融解之抗原為 160K 之結構性抗原，該抗原並非與蟲體細胞膜有關之 *neuraminidase*。然而該抗原之量甚微，每 10¹⁰ 隻錐蟲方可抽出 5 μg。就本文之結果而言，*T. evansi* 錐蟲之中和性抗原似應繼續從與 IgM 有關之抗原著手研究。

凝膠沉降反應之結果顯示錐蟲感染鼠血漿中所粹取之可溶性抗原，與以 Triton-X 自蟲體粹取之結構性抗原係同一物質（圖 3），其

原因尚不明了。Leishmania spp 之研究顯示錐蟲細胞膜抗原有 40 餘種，且感染錐蟲病人之血中含有錐蟲之可溶性抗原與錐蟲抗體之結合體 (complex)^(13,19)。本試驗所得之可溶性抗原顯示與蟲體抗原相同，鼠血漿中之抗原是單純之蟲體抗原，或是如 Leishmania 錐蟲之情形，有待繼續研究。

錐蟲之抗原可區分為固有及變異抗原兩類^(14,18,20)，前者係指錐蟲於寄主體內繁殖時不會隨繁殖代數改變之抗原（蟲體之胞器等固有構造），後者是指會隨繁殖代數改變之抗原（蟲體外衣等構造）。據周⁽⁶⁾之研究顯示，罹患蘇拉病之山羊並無顯著迴歸性發熱現象，故與一般錐蟲感染型態有異。蘇拉病之傳播媒介為吸血昆蟲，其屬機械式之感染與一般錐蟲之生物性病媒不同，此點為錐蟲中少有之特例。因此其免疫反應可能與其他生物性病媒錐蟲之免疫反應不同。

參 考 文 獻

1. 沈永紹。1974。被動性血球凝集試驗做為慢性感染之反芻獸蘇拉病之診斷法之研究。台灣省畜牧獸醫學會會報 25 : 41 - 46。
2. 沈永紹、劉培柏、馮翰鵬。1975。犬蘇拉病實驗病例之臨床病理學研究—臨床觀察。中華民國獸醫學會雜誌 1: 53 - 57。
3. 沈永紹。1977。間接螢光抗體法做為依凡氏錐蟲保蟲牛之檢出法。中華民國獸醫學會雜誌 3: 31 - 66。
4. 沈永紹。1979。人工接種的蘇拉病山羊之免疫抑制現象之研究。中華民國獸醫學會雜誌 5: 19 - 22。
5. 沈永紹、王明生。1982。人工感染依凡氏錐蟲山羊之免疫抑制現象(二)淋巴組織及淋巴球之活性狀態。中華民國獸醫學會雜誌 8: 25 - 31。
6. 周世認。1988。酵素結合免疫吸附法與間接血球凝集試驗法對診斷山羊蘇拉病之比較檢討。中華民國獸醫學會雜誌 14: 175 - 182。
7. 費昌勇、黃天祥、賴秀穗、邱仕炎。1986。豬免疫球蛋白 IgG 及 IgM 特异性抗體之簡易生產法。中華民國獸醫學會雜誌 12: 99 - 105。
8. 費昌勇、黃天祥。1989。牛蘇拉病抗血清 IgG₂ 及 IgM 於簇集反應中之效應。中華民國獸醫學會雜誌 15: 143 - 147。
9. 鄭成昌、陳錦章、林恆雄。1982。免疫擴散法診斷用依凡氏錐蟲抗原之研製及應用。台灣畜牧獸醫學會會報 40: 7 - 13。
10. 劉培柏。1974。犬蘇拉病時之低血糖症原因之研究，碩士論文。台灣大學獸醫學系。
11. Cunningham, M.P., P.M. Balley, C.D. Kimber 1967 The estimation of IgM in dried blood for use as a screening test in diagnosis of human trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 61: 688-695.
12. Dirie, M.F., S.L. Croft and D.H. Molyneux 1986 Morphological changes of Trypanosoma vivax in mice. Vet. Parasitol. 19:23-27.
13. Evans, T.G. and R.D. Pearson 1988 Identification of Leishmanial antigens in the sera of patients with American visceral Leishmaniasis. Infectin and Immunity 56: 3139-3144.
14. Holmes, P.H. 1987 Pathophysiology of parasitic infections. Parasitology 94: S29-S51.
15. Kalu, A.U., J.U. Edeghere and F.A. Lawani 1986 Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of Trypanosomiasis in goats. Vet. Parasitol. 22: 37-47.
16. Kierszenbaum, F. and M.A. Ram-

- irez 1990 Modulation of sensitivity of blood forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated, complement-dependent lysis. *Inf. Immu.* 58: 119-123.
17. Lanham, S.M. and D.G. Godfrey 1970 Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28: 521-530.
18. Levine, N.D. 1985 Flagellates: the Hemoflagellates. pp. 19-58. in *Veterinary Protozoology*. 1st ed Iowa State University Press. Ames, Iowa.
19. Murray, P.J., T.W. Spirhill, and E. Handman. 1989 Characterization of integral membrane proteins of *Leishmania major* by tritin X-114 fractionation and analysis of vaccination effects in mice. *Infection and Immunity* 57: 2203-2209.
20. Nantulya, V.M., J.J. Doyle and L. Jenni 1980 Studies on *Trypanosoma congolense*. II Antigenic variation in three cyclically transmitted stocks. *Parasitology* 80: 123-131.
21. Norris, K.A., G. Harth. and M. So 1989 Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Inf. Immu.* 57: 2372-2377.
22. Parish, N.M., W.I. Morrison, and T.W. Pearson 1985 Identification of an antigen specific to *Trypanosoma congolense* by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134: 593-597.
23. Pinder, M., J. Bauer, A. Van Melick and F. Fumoux. 1988 Immune responses of trypanoresistant and trypanosusceptible cattle after cyclic infection with *Trypanosoma congolense*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 18:245-257.
24. Raina, A.K., S. Kumar and R.P. Singh 1986 discontinuous counter immunoelectrophoresis test for detection of *Trypanosoma evansi* antibody in buffalo calves and its comparison with agar gel precipitation test. *Vet. Parasitol.* 21: 275-278.
25. Schreiner. J.E. and A.J. Pesce 1974 *Immunochemistry*. pp.97-237. In J.M. Brewer et al. (E.D.). *Experimental Techniques in Biochemistry*, 1st ed. Prince-Hall. Inc. New Jersey, U.S.A.
26. Uggla, A. and L.A. Nilsson 1987 Evaluation of a solid-phase immunoassay (dig-elisa) for the serodiagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14: 309-318.
27. Umeda, M. and M. Isoda 1984 Amyloidosis in rabbits infected with *Trypanosoma evansi*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 251-255.

The effect of IgG and IgM antibodies on humoral immune response of swine surra

Andrew C.Y. Fei¹; S.J. Liaw²; W.H. Lin²

1. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University.
2. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

The IgG and IgM antibodies were purified from the serum of the pig inoculated with *Trypanosoma evansi*--the pathogen of Surra. They were separately tested in agar gel precipitation with soluble metabolic antigen in plasma of infected mouse and structural antigen of protozoa treated with Triton X-100. They were also separately mixed with active alive *Trypanosoma evansi* protozoa to observe their effects on the agglomeration test and neutralization test with mice. The evidence is presented here that the agglomeration phenomenon and neutralization of the protozoa could be induced only by the IgM antibody; the agar gel precipitation could be induced only by IgG antibody; and positive reaction of fluorescent antibody test began from second week after first inoculation.

-
1. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University.
 2. Taiwan Provincial Research for Animal Health Tamsui, Taiwan, R.O.C.