

鷄住血原蟲性白冠病免疫擴散試驗 診斷用抗原之研製

吳義興 陳素貞

台灣省家畜衛生試驗所

鷄住血原蟲性白冠病是一種由鷄糠蚊媒介之鷄原蟲病，鷄感染後引起嗜血死亡，尤以小鷄死亡最嚴重，為有效防治本病需發展診斷用抗原。免疫擴散用抗原之製造，以6月齡肉鷄靜脈接種一次1,000隻原蟲孢子蟲，經16天後抽取血清中之抗原。

硫銨法處理適用於較大量抗原之製造，親和性層析可得較純之抗原，但回收較低，過程亦較複雜，僅適用於本病進一步之研究用。試製之2批硫銨純化抗原液經調整其濃度後，檢查92隻感染陽性鷄血清及430隻陰性鷄血清，結果敏感性及特異性均達100%，並與日本製抗原無顯著性差異 ($P < 0.001$)。

早期鷄住血原蟲性白冠病之診斷，除依臨床症狀與剖檢病變外，血液抹片以檢查配殖體之存在是最確實之方法，但卡氏鷄住血原蟲性白冠病之蟲血症期很短，一般其最易辨識期只有4~6天，故血液抹片之時間若不對，則根本無法診出，因此無法摘出存在鷄場之耐過帶原鷄，亦無法得知該鷄場是否曾經感染。

森井⁽²⁾以試驗室飼養之鷄糠蚊培養鷄住血原蟲之孢子蟲，再以含孢子蟲之糠蚊叮鷄，人工感染鷄住血原蟲白冠病，發現鷄感染後第10~15天，血液中會出現一種特異之可溶性抗原，此種抗原與耐過鷄之血清抗體以免疫擴散試驗，可產生明顯之沉降線。由此開發出鷄住血原蟲性白冠病之血清學診斷。

本試驗即以本省分離之鷄住血原蟲白冠病蟲株⁽¹⁾，經試驗室飼養之鷄糠蚊吸入增殖轉

化成孢子蟲，以此種孢子蟲人工感染鷄取得血清中之可溶性抗原，而試製免疫擴散法用診斷抗原。

材料與方法

試驗動物：

Rose 肉鷄，自孵出後即放進 SPF 鷄舍中，以無添加藥物之飼料飼養到約6月齡供用。

試驗用血清：

92隻陽性鷄血清係感染鷄住血原蟲性白冠病鷄，血液塗抹檢查，血液中配子細胞陽性之鷄經採血而得。430隻陰性鷄血清係經檢查無污染本病之鷄場採血而得。

原蟲株及原蟲孢子蟲液之製備：

為筆者在台灣地區分離之 *Leucocytozoon caulleryi* 原蟲株⁽¹⁾，經以鷄及糠蚊交替叮

血及接種而繼代。鷄人工感染後第 21 天，成熟原蟲配殖體出現之初，以試驗室飼養之鷄糠蚊人工強迫叮血，吸血後之鷄糠蚊放 25°C 中飼養，經 72 小時原蟲轉化成孢子蟲後，把糠蚊殺死添加含 5 % 健康鷄血清之 Medium 199 液作成乳劑，以血球計數盤計算乳劑中孢子蟲之含量，經調整濃度後備用。

血清中可溶性抗原之生產試驗：

為瞭解原蟲孢子蟲以何種劑量接種，可在試驗鷄血清中產生最多之可溶性抗原。試驗鷄 16 隻，均分為 4 組，分別靜脈內接種 *L. calleryi* 之孢子蟲各 500、1,000、10,000 及 50,000 隻，接種後第 10 天起，每隔 1 天採血，以免疫擴散試驗法測其血清中可溶性抗原之力價。另為瞭解以不同接種途徑，對可溶性抗原產生之影響，試驗鷄 3 組，每組 4 隻，以同量之原蟲孢子蟲分別以靜脈內、肌肉內及皮下等不同方法接種試驗鷄組，再依上述之方法測試接種後血清中可溶性抗原之平均力價。另試驗鷄 4 組，每組 4 隻，分別以原蟲孢子蟲 1,000 隻，間隔 3 天接種 1、2、3 次及間隔 14 天接種 2 次，接種後隔天採血，以免疫擴散試驗測血中可溶性抗原之力價，以瞭解是否可由多次加強接種而得高力價之抗原液。

可溶性抗原之精製及測試：

人工感染後含可溶性抗原之鷄血清以 4000 ppm 離心 30 分鐘即為「粗製抗原」。此種抗原液分別以 50 % 硫酸銨及親和性層析純化⁽⁷⁾，粗製抗原液加入等量之飽和硫酸銨液，其離心沉澱以蒸餾水溶解後放在半透膜中，於 PBS (pH 7.2) 液中透析而得硫酸銨純化抗原。另把鷄住血原蟲性白冠病之免疫球蛋白，經硫酸銨沉澱及通過 DEAE-cellulose 管柱純化後，結合於 CNBr 活化之 Sepharose-4B (Pharmacia 公司) 膠粒上，把含可溶性抗原之血清液通過此處理後之膠粒，則抗原結合其上，以含 Glycine pH 3.0 之沖洗液把抗原沖洗出，經調整 pH 值及濃縮後，即成「親和性層析純化抗原」。粗製抗原、硫酸銨純化抗原及親和性層析純化抗原分別以免疫擴散試驗測試其反應之結果。

免疫擴散試驗：

依 Morii⁽⁶⁾ 之方法，含 5 % NaCl 之磷酸緩衝液 (pH 7.2) 中，加 2 % 之 Noble agar 及 0.01 % methiolate，加溫溶解並冷凝後，經打孔依次放入抗原及血清，在室溫中經 72 小時後判定。

試製之診斷用抗原應用試驗：

經試製成之抗原液，以免疫擴散試驗測試 90 隻感染陽性鷄血清及 430 隻無污染鷄場之陰性血清，並與日本製抗原 (日本フマシア-株式會社出品) 作比較。

結 果

雞血清中可溶性抗原之生產試驗：

為瞭解鷄接種何種劑量孢子蟲量最適宜。試驗鷄組分別靜脈內接種 500、1,000、10,000 及 50,000 隻孢子蟲，接種後測定血清中可溶性抗原力價。結果如表 1，血清中可溶性抗原最高力價均在接種後第 16 天出現，並依其接種孢子蟲量之增加而力價上昇，但接種量達 50,000 隻孢子蟲時，雖然是 12 月齡之大鷄亦全部發病死亡。

表 1 鷄接種不同量孢子蟲後可溶性抗原產生情形

每隻鷄 接種孢 子蟲量	接種後(天)之平均抗原力價						死亡 率 %
	10	12	14	16	18	20	
500	0	1.50	1.75	3.50	0	0	0
1,000	0	1.75	4.50	8.50	1.25	0	0
10,000	0	2.50	7.00	13.50	1.33**	0	25
50,000	0	3.00	9.50	D4*	ND	ND	100

* D4：4 隻鷄全部死亡。

ND：未測。每組試驗鷄數為 4 隻。

** 第 17 天死 1 隻。

為瞭解不同接種途徑，可溶性抗原產生之情形，試驗鷄分別以靜脈內、肌肉內及皮下接種孢子蟲。其結果如表 2，除靜脈接種外，肌肉內接種在第 16 天產生少量之可溶性抗原，皮下接種完全不產生可溶性抗原。

為瞭解反復接種孢子蟲能否提高其血清中

表2 不同接種途徑對可溶性抗原生產之影響

接種途徑 (孢子蟲) (1000隻)	接種後(天)之平均抗原力價					
	10	12	14	16	18	20
靜脈內	0	1.75	5.00	8.50	1.25	0
肌肉內	0	0	0	1.75	0	0
皮下	0	0	0	0	0	0

可溶性抗原之力價，試驗雞組分別接種原蟲1、2及3次，間隔3天。接種後之雞，血清中之可溶性抗原力價經測定結果如表3，反復接種雞，其血清中之可溶性抗原力價並無顯著性之上昇。

表3 雞反復接種孢子蟲對可溶性抗原產生之影響

接種孢子蟲 之次數	間隔時間 (天)	接種後(天)之平均抗原力價									
		10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
1	0	0	1.75	4.50	8.50	1.25	0	0	0	0	0
2	3	0	1.75	5.00	8.50	1.75	0	0	0	0	0
3	3	0	2.00	5.00	8.75	2.00	0	0	0	0	0
2	14	0	1.50	5.00	8.00	1.25	0	0	0	0	0

* 每組4隻雞，每隻雞每次均各接種孢子蟲1,000隻

場之陰性血清，並與日本製抗原作比較。其結果如表4，除2隻陽性雞血清日本製抗原測不出外，試製抗原與日本製抗原間之檢查結果均一致。

表4 陽性及陰性雞血清以試製之抗原測試結果

血清種類	血清 No.	試製#1		試製#2		日本製	
		+	-	+	-	+	-
陽性血清	92	92	0	92	0	90	2
陰性血清	430	0	430	0	430	0	430

可溶性抗原之精製及測試：

粗製抗原100ml(x8)經硫酸處理後可得約30ml之硫酸純化抗原，而30ml之粗製抗原經親和性層析後，回收約1ml之純化抗原。把粗製抗原、硫酸純化抗原及親和性層析純化抗原分別放於凝膠中，依Morii⁽⁶⁾之方法，與鷄住血原蟲性白冠病特異性抗體作免疫擴散試驗。結果在粗製抗原產生2條較清晰及1條較模糊之沉降線，親和性層析抗原則呈1條細而清晰之沉降線。

試製抗原之應用試驗：

試製2批硫酸純化抗原，經與陽性血清以棋盤式測定法測定其力價後，以2倍之反應力價濃度而使用。試製成之抗原以免疫擴散試驗測試90隻感染陽性雞血清及430隻無污染雞

討 論

為取得較大量之血清以製造較大量之診斷抗原，在本試驗使用6月齡之成年肉雞作人工感染，結果其血清中產生之可溶性抗原力價與接種之原蟲孢子蟲量成正比(表1)。在接種量達50,000隻孢子蟲或以上時，雞開始死亡，故接種量必需少於此數。雞接種孢子蟲數10,000隻時，其血清中產生之抗原力價僅約接種1/10量(1,000隻)者之2倍高，因此認為採用接種量為1,000隻孢子蟲較為經濟。

鷄住血白冠病原蟲之孢子蟲侵入雞體內時，先在脾、胸腺、肝及腎等臟器之內皮細胞形成第一代裂殖體(Schizont)(1、2、3)，

經增殖成多數之裂體性芽胞 (Merozoites)，再散佈全身形成第二代裂殖體，第二代裂殖體成熟破裂放出大量第二代裂體性芽胞，引起患者突然大量出血而死亡，或原蟲進入血流中，侵入紅血球形成配子細胞 (Gametocytes) 而成蟲血症。Morii⁽⁶⁾認為可溶性抗原乃原蟲在裂殖體期代謝之產物，當裂殖體大量增殖時，其代謝產物滲入血液中而成可溶性抗原。由靜脈接種孢子蟲時，原蟲可同時迅速到達內皮細胞，增殖大量之第二代裂殖體，產生大量之可溶性抗原及發育破裂時造成出血病害⁽⁷⁾。當以肌肉或皮下接種時，孢子蟲分批逐漸到達內皮細胞，使其無法同時產生大量之裂殖體，其產生之可溶性抗原，在血液中不易達可測出之濃度。另Morii及Kitaoka⁽⁶⁾以本原蟲孢子蟲反覆接種雞，其產生之蟲血症期間與僅1次接種者無差異，故推論認為孢子蟲侵入內皮細胞時，細胞會產生類似干擾素之物質，此類物質會阻礙繼後到達內皮細胞之孢子蟲形成裂殖體。此種情形在本試驗亦有發現，試驗雞反覆接種孢子蟲，其可溶性抗原產生之力價及時間與單獨1次接種者無顯著性之差異 (表3)。

為顧及實際製造抗原之成本，本試驗使用生長較快之肉雞，但其產生之可溶性抗原力價似乎不及先前之報告中⁽⁷⁾，使用小蛋雞之力價。據陳⁽²⁾之報告，雞之品種不同，其對鷄住血原蟲性白冠病之感受性亦有差異，蛋雞最敏感，肉雞感受性較差，土雞則有很強之抵抗力。可能由於肉雞之感受性較差，故接種後產生之可溶性抗原之力價亦不若使用蛋雞者高。

鷄住血原蟲性白冠病抗原液之取得，除需使用大量無感染本病之大雞外，尚需飼養大量之雞糠蚊以供培養原蟲孢子蟲，由於此種雞糠蚊之飼養不易，需有專人細心培育，而致抗原液之製造成本相當高，工作日程及配合亦不容

易控制，若能以單層細胞培養或其他試管培養方式取得大量之原蟲孢子蟲，則抗原之製造將更為簡易，此應為今後研究開發之目標。

參 考 文 獻

1. 吳義興。1989。Leucocytozoon caulleryi 之生活史及鷄住血原蟲性血冠病之血清學診斷。國立台灣大學獸醫學研究所博士論文。
2. 陳志峰。1989。鷄住血原蟲性白冠病抗病育種研究。國立中興大學畜牧學研究所碩士論文。
3. 秋葉和溫、關谷修三。1975。Akiba caulleryi の第一代 schizont について。第79回日本獸醫學會要旨。
4. 森井勤、松井利博、飯島利彥、福田稔、藤永福美惠、藤野隆志、小川由利子。1982。Leucocytozoon caulleryi の第1代 schizont の電子顯微鏡觀察。第94回日本獸醫學會要旨。
5. Morii. T. 1972. Presence of antigens and antibodies in the sera of chicken infected with *Akiba caulleryi*. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart 12: 161-167.
6. Morii T. and S. Kitalka. 1969. Susceptibility of chickens of different ages to sporozoites of *Akiba caulleryi* at various doses. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 9: 104-111.
7. Pharmacia Fine Chemicals. 1979. chromatography, principles and methods. Sweden.

Production of agar gel precipitation antigen of Leucocytozoonosis

Y.S. Wu and S.J. Chen

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

For producing agar gel precipitation test antigen, 6 month old broilers were inoculated intravenously with 1,000 sporozoites of Culicoies arakawae. Sixteenth day after inoculation, the chicken was bled for soluble antigen.

After centrifuging, soluble antigen was purified with ammonium sulfate. This method, could yield more antigen than that purified with affinity chromatography. However, affinity chromatography purified antigen could be used on advanced research. Two lots of ammonium sulfate purified antigen were used in agar gel precipitation test for 92 positive sera and 430 negative sera, and showed 100% both in sensitivity and specificity. There are no significant difference between the soluble antigen prepared in this experiment and the same antigen produced in Japan.