

牛蘇拉病抗血清 IgG₂ 及 IgM 於簇集反應中之效應

費昌勇 黃天祥 馬屏禾

台灣省家畜衛生試驗所

自以蘇拉病錐蟲蟲體抗原免疫之牛血清中純化得 IgM 及 IgG₂ 抗體，以之與蘇拉病錐蟲進行簇集反應 (Agglomeration) 試驗。結果僅 IgM 及全血清可引發簇集反應，而 IgG₂ 及陰性牛血清則無法引發上述反應。IgG₂ 雖不能引發簇集反應，但懸浮於 IgG₂ 抗體中之活蟲，其活動時間仍較對照組為短。

蘇拉病是本省光復至今一直困擾反芻獸家畜之重要住血原蟲性疾病。據沈之研究得知除牛、馬、豬外，犬亦可建立感染^(2,6)，且罹患本病之家畜會有免疫抑制現象^(4,5)。在其診斷方面，沈更建立了間接螢光法⁽³⁾及被動性血球凝集試驗⁽¹⁾測定宿主血清抗體。此外，鄭亦用凝膠沈降法研製得沈降抗原⁽⁸⁾。在國外蘇拉病之研究可謂寥若殘星，在其他錐蟲方面之研究，在診斷方面有：Elisa 法⁽²¹⁾，血容比離心法⁽¹³⁾，快速免疫電泳法⁽¹⁸⁾等；在免疫反應方面之研究亦得知感染錐蟲之哺乳動物會因蟲體抗原之不斷變化而有規則性發燒現象^(12,16,20)。由於宿主對錐蟲之感染有如此複雜之免疫反應，且蘇拉病錐蟲在本省亦十分普遍。故筆者擬自抗體之分類著手研究宿主對本蟲之各種免疫反應。本文則是自不同種類抗體對本蟲所產生之簇集反應現象開始，以進行研究。

材料與方法

錐蟲 *Trypanosoma brucei evansi* 之繁殖及淨化

以本所生物系寄生蟲室自行保存之 *T. b. evansi* 接種小白鼠，於 2~3 天後以檸檬酸鈉抗凝劑自心臟採血，然後直接通過經磷酸緩衝液（每公升溶液含 Na₂HPO₄、12 H₂O 17.0 g, NaH₂PO₄、2 H₂O 0.39 g, NaCl 2.12 g, Glucose 20 g, pH 7.6）平衡後之 DEAE Cellulose 層析柱，以取得不含血球等雜質之潔淨蟲體⁽¹⁴⁾。

蘇拉病高度免疫牛血清之製備

上述經淨化之錐蟲以超音波打碎，加 Freund 完全佐劑，乳化後於牛體背部及四肢等分 10 處行肌肉免疫注射。每週一次，共四次。最後一次免疫後兩週採血，分離血清。免疫前所採之血清做為陰性血清。

牛血清 IgM 及 IgG₂ 之分離

血清經 40% 硫酸銨純化後，按費等⁽⁷⁾之方法分離牛 IgG₂。簡言之，即以 0.01 M NaH₂PO₄、pH 7.6 為基本溶液 (Initial

buffer)，以含 1 M NaCl 之基本溶液為最終溶液 (Limit buffer)，做線性濃度之陰離子交換樹脂層析，首先出現之尖峯經回收後，再以 Sephacryl S-300 純化一次，即得純化之 IgG₂。IgM 之分離係按 Porter 及 Noakes⁽¹⁷⁾ 之方法，即上述經 40% 硫酸銨純化之牛血清，經 Sephacryl S-300 層析，取第一尖峯，反覆三次，即得牛之 IgM。

牛 IgG₂ 及 IgM 之鑑定係以抗牛全血清、抗牛 IgG₂ 及抗牛 IgM 之標準血清 (Nordic Immunological Laboratories, Langestra, P.O. Box 22, 5000 AA, Tiburg, The Netherlands)，分別做免疫電泳及凝膠沈降法⁽¹⁹⁾ 為之。

簇集反應

將上述純化之牛 IgG₂、IgM，高免血清及免疫前之陰性血清分別以 2 倍階梯稀釋，

自原液至 32 倍共 6 種不同濃度，與純淨之錐蟲等量置於載玻片上，於顯微鏡下觀察簇集反應之發生。

結 果

牛 IgM 及 IgG₂ 之純化

經吾人純化之牛 IgM 及 IgG₂，經免疫電泳法之鑑定，均分別於適當之免疫電泳位置出現單一沈降線，故知屬純物質 (圖 1)。彼等再經特異性標準抗血清反應，亦呈陽性沈降反應 (圖略)，故知為牛 IgM 及 IgG₂ 無誤。

簇集反應

以純化之牛 IgG₂、IgM，陽性血清及陰性血清分別以 2 倍階梯稀釋，自原液至 32 倍共 6 種不同濃度，與純淨之錐蟲懸浮液，以等量置載玻片上，於顯微鏡下觀察。結果如表 1 及圖 2。



圖 1 牛 IgG₂ (G₂) 及 IgM (M) 與抗牛全血清 (AWS) 之免疫電泳圖



圖 2 蘇拉病錐蟲之簇集反應。

- a. 經淨化之蟲體與 IgM 抗體接觸後之初期，有部份蟲體開始接觸並發生絞紐現象 (箭頭所示)。× 160。
- b. 多數蟲體絞紐之現象。× 250。
- c. 左圖放大。× 400。
- d. 經與 IgM 抗體反應後發生變形及凝集成塊狀之蟲體。160。

表 1 在不同抗體種類及濃度下簇集反應之變化

抗體種類	抗 體 稀 釋 倍 數					
	原液	2	4	8	16	32
IgM	++	+++	++	+	-	-
IgG ₂	-	-	-	-	-	-
陽性血清	++	+	+	-	-	-
陰性血清	-	-	-	-	-	-

- +++：玻片上絞紐之錐蟲凝結成 200 隻以上蟲體之巨大團塊，蟲體嚴重變形。
- ++：玻片上絞紐之錐蟲凝結成 50 ~ 200 隻左右蟲體之團塊，蟲體輕度變形。
- ++：半數玻片上絞紐之錐蟲凝結成 50 隻以下之蟲體之團塊，蟲體輕度變形。
- ：玻片上之錐蟲未絞紐，未出現任何錐蟲凝結之團塊，蟲體亦未見變形。

由表 1 可知造成簇集反應者為陽性血清及陽性血清中之 IgM, IgG₂ 則未發生上述反應。陽性血清及 IgM 所造成之簇集反應，亦因抗體之稀釋濃度而有差異。基本上，濃度越淡，簇集反應發生的越慢，且蟲體聚集的團塊越小。然而若濃度過高時，簇集反應反較弱（表 1），故知此反應亦有前區現象（Prozone Phenomenon）。

簇集反應之發生係逐漸進行。當活動之蟲體與陽性抗體接觸後，原本個別運動之蟲體會逐漸聚集，彼此絞紐在一起運動（圖 2a），絞紐之蟲數從兩隻逐漸增加（圖 2b、2c）。視 IgM 抗體之濃度，於 15 分至 30 分不等時間後，絞紐在一起之蟲體即逐漸喪失活力而停止運動。絞紐之蟲數，則隨抗體之強度而有差異。抗體濃度越高者，蟲數多且絞紐成塊狀（圖 2d）；反之，抗體濃度弱者，蟲體較少。但此反應並不違反前區現象，即抗體濃度過強者，此反應反弱（表 1）。簇集反應強者，蟲體有嚴重變形（圖 2d），簇集反應弱者蟲體之變形亦弱。

此外，IgG₂ 雖未造成簇集反應，但蟲體於接觸 IgG₂ 後於 30 分至 60 分鐘開始停止運

動。懸浮於 PBS 之對照組蟲體則於 5 小時後仍十分活躍，二者之差異明顯。

討 論

此試驗研究係在初步探討 IgM 及 IgG₂ 對本蟲蟲體在免疫學上之功能。結果顯示一般所謂簇集反應，主要是發生在 IgM 對蟲體之作用，而與 IgG₂ 抗體無關。至於 IgG₂，則雖然不會造成簇集反應，但仍可使本蟲之運動停止。其作用機轉，及蟲體之存亡，均不清楚。

錐蟲之抗原，一般可分為固有抗原（Stable antigen）及變異性抗原（Variable antigen）兩類。前者係指當錐蟲在哺乳動物宿主體內繁殖時蟲體身上有一些不會發生變異之抗原，如蟲體內之酵素、細胞膜上之固有構造，或胞器（organelles）等；這些抗原不會隨蟲體之繁殖代數（Population）而有變異。反之，本蟲另有一部份抗原則會因在宿主體內之不同繁殖代數而有變化，這些抗原均存於蟲體之外衣（Surface Coat）。當進入中間宿主體內繁殖時，此外衣即脫落，其變異性抗原即消失^(11,12,15,16)。本文所研究之蘇拉病錐蟲，並不會在中間宿主體內發育，其傳播病媒雖亦為吸血昆蟲（*Tabanus Spp.*, *Stomoxys Spp.*, *Haematopota Spp.*），但僅為機械性傳播，錐蟲在傳播過程中僅存於病媒之口器（Proboscis）中⁽¹⁵⁾。因而此類錐蟲之抗原變化，因生活史之特異性，可能與其他錐蟲有異。然而，至今尚無有關本蟲之報告，是以值得研究。

感染錐蟲之哺乳動物血清中，IgM 之值均會異常升高，係吾人熟知之事實⁽¹⁰⁾。本研究顯示，在沒有補體存在之下，IgM 可造成錐蟲之簇集反應，並造成蟲體之嚴重變形，足見 IgM 在本病之防疫上十分重要；且由其具前區現象特性，顯示此乃一純粹之抗體抗原反應。至於 IgG₂，雖亦可造成蟲體之靜止，但其致害性似不如 IgM 明顯。此僅為就結果所做之初步推論，蓋抗體之濃度及特異性等影響因子尚未列入。牛之 IgG 有 IgG₁ 及 IgG₂ 兩類，在牛奶中，主要成分為 IgG₁，在血清中，二者均存在⁽⁹⁾。由於 IgG₁ 自血清中極

雜純化⁽¹⁷⁾，故本研究僅純化出 IgG₂ 以進行試驗。但為欲了解 IgG₂ 對錐蟲之免疫反應，筆者等亦直接以不溶性色層分析 (gel filtration) 分離出血清 7 S 部分之抗體成份。經標準抗 IgG₁ 抗血清作用有陽性反應，與蟲體進行反應，結果並未出現簇集反應，故知簇集反應似亦應該與 IgG₁ 無關。關於此點，筆者等當力求於日後努力突破 IgG₁ 之分離技術，再進行研究，另做專文報告。

本文所純化之 IgG₂ 和 IgM 在進行簇集試驗過程中未予定量，而僅以『濃度』表示。此因牛之抗體種類錯綜複雜，且本研究亦非免疫球蛋白化性之研究，定量並無意義，故未予定量。

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。臺灣省畜獸醫學會會報。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。3:31~36。
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、王明升 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. 寧一新、沈永紹 1980。人工感染蘇拉病犬血清蛋白質之消長。中華民國獸醫學會雜誌。6:7~11。
7. 費昌勇、張惟茗、楊揚輝、邱仕炎 1986。經福馬林固定之牛脾臟細胞內免疫球蛋白免疫酶染色法。中華民國獸醫學會雜誌。12:37~42。
8. 鄭成昌、陳錦章、林恒雄 1981。免疫擴散法診斷用依凡氏錐蟲抗原之研製及應用。動物醫學雜誌，15:27~31。
9. 劉榮標 1984。抗體之結構與形式。P 625~642，獸醫微生物學，第一版。國立編譯館。
10. Cunningham, M.P., N.M. Bailey, 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.
11. Dirie, M.F., S.L. Croft and D.H. Molyneux 1986 Morphological changes of *Trypanosoma vivax* in mice. Vet. Parasitol. 19:23-27.
12. Holmes, P.H. 1987 Pathophysiology of Parasitic infections. Parasitology 94:S29-S51.
13. Kalu, A.U., H.U. Edeghere and F. A. Lawani 1986 Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of Trypanosomiasis in goats. Vet. Parasitol. 22:37-47.
14. 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.
15. Levine, N.D., 1985 Flagellates: The Hemoflagellates, pp.19-58. in Veterinary Protozoology. 1st ed. Iowa State University Press.
16. 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.
17. Porter, P. and D.E. Noakes. 1970. Immunoglobulin IgA in bovine ser-

- um and external secretions. Biochem. Biophys. Acta. 214:107-116.
18. Raina, A.K., S. Kumar and R.P. Singh 1986 Discontinuous counter-immunoelectrophoresis test for detection of Trypanosoma with agar gel precipitation test. Vet. Parasitol. 21:275-278.
 19. 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. Peince-Hall, Inc. New Jersey, U.S.A.
 20. Turner, M.J. 1984 Antigenic variation in parasites. Parasitology 88:613-621.
 21. 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.

THE EFFECT OF IgG₂ AND IgM ANTIBODIES ON THE AGGLOMERATION TEST OF BOVINE SURRA

Andrew C.Y. Fei, T.S. Huang, Gloria P.H. Mar*

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

The IgM and IgG₂ antibodies were purified from the serum of the cow immunized by the *Trypanosoma brucei evansi* the pathogen of Surra. They were separately mixed with active alive *T.b. evansi* protozoa to observe their effects on the agglomeration test. The evidence is presented here that the agglomeration phenomenon of the protozoa can be induced only by the IgM antibody, but not by the IgG₂ antibody. However, the movement of *T.b. evansi* was inhibited when suspended in IgG₂ antibody solution.