

動物用生物診斷液於不同保存期間之力價消長

25-13

劉敏主 陳忠松 蘇杰夫

台灣省家畜衛生試驗所

就本省市場上動物用診斷液或抗原，於經過存放一段時間之後，測定其特異性和效價。在六種現有診斷液中有四種如牛結核菌素、牛布氏桿菌、鷄慢性呼吸器病及新城鷄瘟等抗原診斷液穩定性最好；而雛白痢診斷液亦不差，僅猪萎縮性鼻炎診斷液在失效期之同時，會有非特異性之凝集現象。

在許多動物疾病的診斷上，或者疫情監測，或者疫苗使用時機之選定，診斷用抗原一直扮演重要的工具^(1,2,7)。而診斷液之開發，研究也一直努力不懈^(1,7)，許多具有商品化價值的診斷液，不但初檢時能符合國家標準，且其敏感性、特異性在適當保存下，都能使其在有效期內維持一定的效價。不論成品與否，許多研究者在開發診斷液之後或同時，皆會注意到保存性的測定，測定結果，有些僅可存放一年左右，有些則測出保存溫度影響到抗原的穩定性甚大。^(1,2,3,4,5,6)因此診斷液是否常在正常效價之內，有必要作一瞭解，並供以後不定期之監測參考。

材料與方法

1. 供試診斷液種類：

包括萎縮性鼻炎 (AR)、雛白痢 (S. P.) 新城鷄瘟血球凝集 (ND-HA)、鷄慢性呼吸器病 (CRD)、牛布氏桿菌 (Br.) 及牛結核菌素 (PPD) 等 6 種市售診斷用抗原。

2. 天竺鼠：

選體重 500 公克以上之健康天竺鼠作 PPD 測定用。

3. 試驗方法：

(1) AR 診斷用菌液保存性測定：

市面上現僅一種廠牌，將該製品放於 4°C 存放不同月份後，分別以下述二法測定：

① 急速平板凝集反應：將被檢菌液約 0.03 cc 與同量陽性及陰性血清，分別於清淨玻璃板上充分混合後，在一分鐘內抗原須與陽性血清呈顆粒狀凝集，陰性血清則不凝集。

② 試管凝集反應：將被檢菌液以緩衝生理食鹽水稀釋 50 倍後，與同量 (約 0.5 cc) 而經稀釋 (如 80 倍以上) 之陽性血清及陰性血清在試管內充分混合後，置 37°C 恆溫器內反應 2 小時，再置 4°C 冷室一夜後，陽性血清組須凝集，陰性血清須不凝集。

(2) S. P 診斷用菌液保存性測定：

市面上現僅一種廠牌，將該製品於 4°C 存放不同月份後，分別依上述(1)之二法測定之，其判定亦類似。

(3) ND-HA 抗原保存性測定：

市面上現僅一種廠牌，將該製品不同批號於 4°C 存放不同時間後，測定其凝集力價—即將製品溶解於生理鹽水後，以二

進法稀釋，並將各階稀釋液與等量 0.5% 雞紅血球混合，置室溫 60 分鐘後，判定其凝集價。

(4) 雞 CRD 診斷用菌液保存性測定：

市面上僅一種廠牌有現品，將其保存 9 個月至 42 個月期間內之 5 批號樣品，每隔 3 個月分別取出測試共測定 3 次，測定時以 *Mycoplasma Gallisepticum* 與 *Mycoplasma Synoviae* 之陽性血清二種及陰性血清一種分別以平板反應如以述方式測定，結果 MG 之陽性血清須於一分鐘內呈顆粒狀凝集，MS 之陽性血清及陰性血清於二分鐘內亦不得呈顆粒凝集。（如產品為 MS 之抗原，則僅能和 MS 陽性血清作用）。

(5) 牛布氏桿菌病診斷用菌液安定性測定：

市面上現僅一種廠牌，將不同批號製品於 4°C 存放不同時間後，分別和 30 單位標準血清及野外強陽性血清和弱陽性血清及陰性血清等依上述平板反應法方式測定，結果陽性血清組須在五分鐘內凝集，而陰性血清則不得凝集。

(6) 牛 PPD 結核菌素診斷液保存性測定：

市面上僅一種廠牌，將其不同批號，不同存放時間之製品和標準抗原依法比較：將體重 500 公克以上健康天竺鼠，每次五隻，各注射牛型結核菌流動石臘浮游液，使其敏感化，經六週後，於每隻背部注射製品 1,000 倍稀釋後之液體 0.1 cc，

對於對測依同法注射標準品，經 24 小時後，比較二邊紅腫脹程度，製品紅腫脹程度以不高於及不低於標準品 20% 為合宜。

結 果

1. AR 診斷液保存性：

以平板法和試管法測定 AR 診斷液之結果顯示在保存 4°C 後之第 6 及第 12 個月時，對陰性血清及生理食鹽水有自家凝集之現象（表 1），而對於陽性血清之凝集情形仍甚良好，皆在一分鐘內即見顆粒之形成。

2. S.P 診斷液保存性：

八批不同批號之難白痢診斷液在 4°C 放置不同時間後，亦以平板及試管法測定效價，結果其中有一批在保存第 12 個月時之試管凝集反應測試時，對陰性血清呈自家凝集之現象，而陽性血清稀釋 200 倍之測試不易判定。（表 2）。

3. ND-HA 抗原保存性：

不同批號之 ND 紅血球凝集抗原於 4°C 存放不同月份後，分別取出測定其血球凝集價，結果顯示在存放 16 個月後仍全部保有原來力價，20 個月後則力價降低一半。（圖 1）。

4. 雞 CRD 診斷液保存性：

將 5 批雞 CRD 抗原分別以 MG、MS 陽性血清及陰性血清每隔 3 個月測試一次，結果對於 MG 陽性血清凝集反應時間皆小於

表 1 AR 診斷液之保存性試驗

測 試 別	血 清	保 存 期 間 (月)			
		0	3	6	12
平板凝集法	陽性血清	+	+	+	+
	陰性血清	-	-	*±	*±
試管凝集法	陽性血清	×160	×160	×160	×160
	陰性血清	-	-	*	*

* 有顆粒狀之非特異凝集 * 菌體不易沈降到試管底部

表 2 S.P 診斷液之保存性試驗，其中一批自家凝集情形

測 試 別	血 清	保 存 期 間 (月)				
		0	3	6	9	12
平板凝集反應	陽性血清	+	+	+	+	+
	陰性血清	-	-	-	-	-
試管凝集反應	陽性血清	×200	×200	×200	×200	* ?
	陰性血清	-	-	-	-	* ?

* 有自家凝集塊之出現

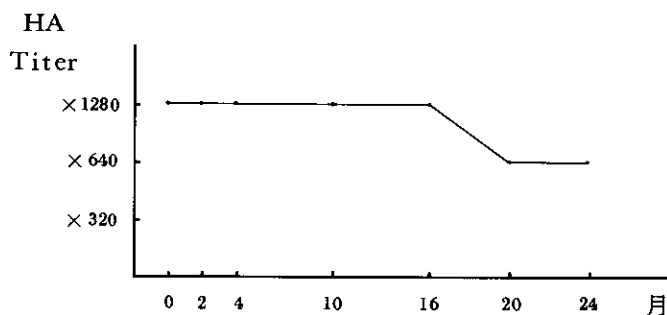


圖 1 ND血球凝集抗原保存性試驗

60秒，合於標準，但對MS陽性血清和陰性血清則不凝集（表3）。該診斷液最久存放時間達42個月，其平均凝集時間不超過15秒。

5. 牛布氏桿菌病診斷液保存性：

不同批號之布氏桿菌診斷液於4℃存放同時間後，分別和強、弱、30單位陽性血清及陰性血清以平板法測試後，皆能在5分鐘

（300秒）內和三種陽性血清呈現凝集現象，其中對強陽性血清凝集時間最快，大約都在15秒之內，弱陽性血清和30單位血清則需2~3分鐘左右才有凝集情形。陰性血清則無非特異凝集現象，顯示該診斷液安定性良好。（表4）

表 3 雞CRD抗原之保存性試驗*

批 數	(*) MG 陽性血清	(*) MS 陽性血清	陰性血清
5	+	-	-

* 五批診斷液3個月起至42個月，每三個月測一次之凝集情形。

表4 牛布氏桿菌病診斷液之安定性試驗

血清別	保存期間 (月)				
	0	3	6	9	12
野外強陽性血清	△10.6	11.2	11.3	11.1	14.9
野外弱陽性血清	184	190.5	160.5	171	151
30單位標準血清	93	147	118	151	145
陰性血清	-	-	-	-	-

△：凝集時間單位：秒

-：無凝集

6. 牛 PPD 結核菌素保存性測試：

利用天竺鼠之過敏性反應測試法，將不同批號之 PPD 製品和標準抗原比較，結果

製品之腫脹程度值和標準品相比較都在 1.00 之上，如圖 2。

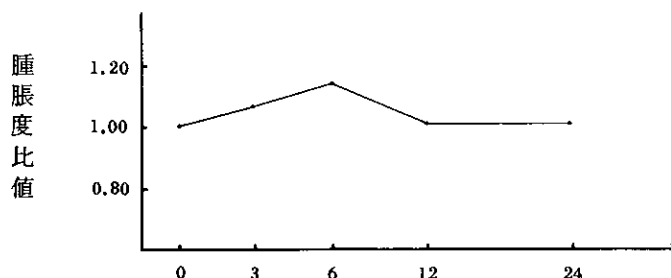


圖2 PPD結核菌素保存性測定，五批受測品與標準品之腫脹度比都在 1.0 以上。

討 論

AR 診斷液保存性試驗，於 4℃ 保存之第 6 及第 12 個月時，對陰性血清及生理食鹽水有自家凝集現象，因受測品只有一批，是否為保存期間，冰箱發生冷凍現象未能察覺也說不一定，因日後曾再測試另一批次，已無此情況，但該斷液之效期為半年，因此雖在第 6 個月測試時有自家凝集情形，尚無不當之處，如須延長有效期限尚待日後評估。雞白痢診斷液保存性試驗，8 批中有一批在保存第 12 個月起，有自家凝集現象，顯示此診斷液保存性已相當好，而只有一點點缺陷，而製品之效期亦為半年，已無不妥之處，此一現象在製造過程 GMP

實施後，一切步驟將趨於穩定，應可改善。

NDHA 抗原保存性試驗，於 4℃ 保存 16 個月後，仍保有原來力價，20 個月後，力價降低一半；因初製品力價高，雖然降一半，仍在國家標準 500 倍以上；該抗原據 Lu⁽⁵⁾ 報告，若保護劑改良後，其乾燥品較美觀，且能保存二年力價不變。雞 CRD 診斷液，存放 42 個月，其對標準陽性血清，平均凝集時間不超過 15 秒，且無自家凝集現象。牛布氏桿菌病診斷液，於存放不同時間後，皆能在 5 分鐘內和三種陽性血清呈現凝集現象，且保有極一致凝集情形，陰性血清則無非特異凝集現象，顯示該二種診斷液安定性良好。牛 PPD 結核菌素保

存性測試，4℃保存後24個月後，對陽性天竺鼠之腫脹程度值和標準品相比較在1.00以上，且不高於標準品20%，顯示PPD在存放24個月後，品質尚符於標準品以上。

在現有市售6種診斷液中，有效期除PPD為2年，NDHA為一年外，其餘4種皆為半年。經以上測試結果顯示AR診斷液非特異性反應情形會在失效期當時發生，因此須加注意外。S.P之非特異凝集有一批出現時間在第12個月，雖和效期6個月相比較無問題，但如想延長效期，則亦應再加以改進。政府推行藥廠GMP制度後，亦有規定須作安定性（或保存性）試驗，各製造廠本身應定時檢討產品之穩定性。

參 考 文 獻

1. Huang C.C., Jong M.H., Lai S.Y., Preparation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit and its Application on Diagnosis of Transmissible Gastroenteritis in Taiwan. The Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry., 51: 57-64 Jun 1988.
2. Liao S.C., Cheng C.S., Chiu T.C., Fu H.M., Study on the Production of Fasciola Hepatica Antigen. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 11: 51-55 1974.
3. Liao S.C., Cheng J.S., Yang Y.H. The Production and Test of Toxoplasma Antigen for Diagnosis of Swine-Dried Glutaraldehyde Treated Sheep Erythrocyte Antigen. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 20: 25-30 1984.
4. Liao S.C., Yang M.S., Studies on the Production and Utilization of B.D.B. Fixed & Freeze-dried Erythrocytes sensitized with Toxoplasma antigen. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 6: 75-80 1982.
5. Lu Y.S., Lin D.F., Tsai H.J., Lee C., Lee Y.L., Chiu S.Y., Lieu Y.H., Huang S.T., Development and Field Application of Diagnostic Antigen and An Inactivative Vaccine Against Egg-Drop Syndrome-1976. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 21: 105-111. 1985.
6. Wu Y.S., Yang Y.H., Lee S.C., Preparation and Application of Brucella milk ring test antigen. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 20: 11-15 1984.
7. Yang Y.H., Wu Y.S., Shiao J.R., Lee S.J., Huang C.C., Liaw S.J., Lee S.H., Chang W.M., Chiu S.Y. Development of a Diagnostic antigen and serological survey of bovine leukosis in Taiwan. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 23: 1-6 1987.

Stability Tests on Animal Diagnostic Antigens

M.C. Liu, C.S. Chen, J.F. Su

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

The stability tests were applied on animal diagnostic antigens to evaluate their specific reactions and potency. Four of six kinds of diagnostic antigens in the market, such as PPD, Bovine brucellosis, CRD and Newcastle disease antigens, showed quite stable after storage in good conditions. The antigen of S. pullorum, however, worked well two before expiring date. Only the antigen of Atrophic rhinitis had non-specific reaction of auto-agglutination at the time of expiring date.