

## 台灣牛立克次體之分離及補體結合、免疫 抗原研製與應用

蘇 杰 夫

### 台灣省家畜衛生試驗所

由台北縣轄內酪農戶，疑患立克次體症牛群之血液，經摘脾仔牛之接種感染，分離出 Rickettsiales，為究明其病原性，將此感染牛之血液再以人工接種摘脾仔牛，仍可致牛隻呈 40~41°C 稽留熱型，紅血球驟降至 300 萬/mm<sup>3</sup> 以下，且有貧血、黃疸等臨床症狀，隨後漸次衰弱，消瘦，呈慢性微候耐過；依病原體於紅血球內呈現之形態及該感染牛之血清行血清學反應，鑑定為 *A. marginale* 立克次體。

就此 *A. marginale* 感染牛血液，經溶血，收集該小體，經數次均質化與超音波處理，製成補體結合抗原，再與標準血清及日製抗原對野外自然感染病例牛血清比較反應試驗，顯示該試製 CF 抗原之特異性甚高。

依 *A. marginale* 分離株人工接種摘脾仔牛，俟發症，血中病原體之寄生率達 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>/mm<sup>3</sup> 時全放血，收集病原體感染血液，經遠心濃縮後，一部份加入含 10% 健康牛血清之葡萄糖磷酸緩衝液 (phosphate buffered glucose; PBG) 的抗原稀釋液製成活性免疫抗原；另一部份經溶血，收集 *A. marginale* 小體，以 glutaraldehyde 不活化後加入 DEAE-Dextran 佐劑製成不活化免疫抗原。該等免疫抗原對 6 月齡及 1.5 歲齡以上田間牛隻之免疫效果，顯示活性抗原較不活化免疫抗原對牛隻血中 CF 抗體的產生為佳，且抗體持續時間也較長。

牛邊蟲症 (Anaplasmosis) 係由 Rickettsiales 目 Anaplasmataceae 科中之 Anaplasma 屬感染之傳染性疾病，使感染動物引起發熱、貧血、黃疸為主徵，故原先稱之為膽汁熱 gall sickness。本症主要由吸血昆蟲，諸如 Argas、Boophilus、Dermacentor、Haemaphysalis、Hyalomma、Ixodes 及 Rhipicephalus 等機械性之媒介感染，仍為 Tick-borne disease 症之一種，分布世界各地，日本更將本症列為家畜傳染病預防法內之法定傳染病，故對輸入牛隻必施予本病嚴格之檢疫，對血清學反應陽性牛皆予撲殺，可見其被重視的程度。

吾國牛隻之住血微生物除了已被證實之 Babesiidae 及 Theileriidae 外，於 1966 年張氏等<sup>(1)</sup>及 1968 年 Otte<sup>(2)</sup>已確認本症之發生，並於 1979 年由 Fölsch<sup>(3)</sup>藉毛細管凝集 (capillary-tube agglutination; CA) 反應及血液塗抹檢查，證明台灣除牛隻之外，山羊、綿羊等反芻獸亦有存在，由於當時牛隻飼養頭數不多，故未被重視，直到近幾年來，政府積極發展乳業，由國外引進種牛遽增，且本症也每年相繼發生，筆者<sup>(4)</sup>更於 1984 年以日製補體結合 (complement-fixation; CF) 抗原進行台中、新竹、桃園等縣轄內酪農牛隻本症疫情調查，證實部份牛隻已持有

*A. marginale* 之 CF 抗體，且新竹以北地區更有高達 72.2 ~ 80.0 % 之陽性率，確切本症已對台灣牛群構成威脅，近年來北部地區牛隻之異動較大，有逐漸擴大蔓延的趨勢，對其防疫實不容遲疑；1981年吾國曾首試輸售肉牛予日本 12 頭中，被檢出 4 頭俱有本症之 CF 抗體<sup>(6-6)</sup>，終至整批牛隻於檢疫站被撲殺燒焚，影響此後牛隻之輸出；*A. marginale* 感染牛隻除體溫上升、食慾減退、精神不振、急性黃疸及貧血等臨床症狀外，間接致使病畜之泌乳量急速下降，懷孕母畜也致流產，且雖經治療，將致泌乳中斷之副作用大，藥劑殘留，影響產乳量及乳汁品質至鉅；牛隻住血微生物在防範上曾有專家們主張媒介昆蟲之撲滅，美國也曾對牛群施予藥浴而絕滅住血微生物成功，但由於各種住血微生物之媒介宿主之不同，其習性也相異，就台灣牛隻目前之飼養管理環境，若依驅除媒介昆蟲之措施，以期絕滅住血微生物似有困難，再則對牧野藥劑之散佈也將造成環境污染及殘留於畜產品之藥物，其對人畜之安全等問題仍是不可忽略；由於 *A. marginale* 感染牛體內保有該小體，引起 *pre-munition* 之持續感染免疫，致患畜成終身免疫，耐過後可抵抗再感染，因此常被應用，就感染牛血液直接接種牛隻方式，以控制本症的發生。咸認台灣目前尚未有本症之診斷及免疫抗原之開發，以供防疫所需，本試驗旨在就台灣分離之 *A. marginale* 研製血清學反應、活性及不活化免疫等抗原，探討其實際應用效果，供將來台灣牛隻本症疫情分析及牛隻免疫抗體產生情形，期擇取適當之免疫方法，俾利養牛業者，達成發展乳業的目的。

### 試驗材料與方法

一材料牛隻試前之處理及免疫試驗用牛隻：

將供試 3 ~ 4 月齡肉用仔牛，經特定傳染病（如結核桿菌、布氏桿菌及白血病等症）檢驗為陰性者，經 Rompum [2-(2,6-Xylylidino-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine hydrochloride; Bayer Leverkusen, 1 ml/100kg, IM] 全身麻醉後，以外科手術，將脾臟摘除，並經自家血液之輸血，

10 ~ 14 天護理療養，並採血檢驗，臨床觀察，一切須呈正常狀況復元，供試驗所需。

另供免疫試驗用野外牛隻，為新竹縣轄內酪農戶之 B 牧場 22 頭，其中 6 月齡者 10 頭，其餘 12 頭為 1.5 歲齡以上，供活性免疫抗原試驗；A 牧場 12 頭，其中 6 月齡者 7 頭，其餘 5 頭為 1.5 歲齡，供不活化免疫抗原試驗。該等牧場皆為 *A. marginale* 陽性場。

二供 *A. marginale* 分離之材料及抗體測定血清：

依台北縣轄內某酪農戶疑患立克次體症牛群，於發熱期，採取 5 頭之血液，每頭 20ml 經混合脫纖保存於 4 ~ 10°C 輸送箱內，帶返本所供分離用。另採取該牧場之 8 頭無臨床症狀之牛隻血液，經分離之血清連同前述 5 頭疑患本症之血清共 13 例，供 CF 抗體之測定用。

三 *A. marginale* 之分離及病原性試驗：

將由台北縣轄本症疑患牛隻 5 頭之混合脫纖血液 50 ml 皮下接種，另 50 ml 靜脈注射於上述摘脾肉用仔牛，隨後每天觀察其臨床症狀、量體溫，且間隔二日檢查病原體及紅血球數之計數。將前述分離之 *A. marginale* 再次依同法接種另一頭摘脾牛，究明該分離株之病原性。四補體結合抗原之製作及反應術式<sup>(3)</sup>：

1. *A. marginale* CF 抗原：將上述 *A. marginale* 分離株，接種摘脾牛，俟血中 *A. marginale* 出現達  $10^4/\text{mm}^3$  以上時，全放血並加入 Alsever 以防血液凝固，把此感染 *A. marginale* 血液，經 4,000 rpm，10 分鐘遠心洗滌三次後，以 10 倍沉澱血球量之冷蒸餾水於 4 ~ 10°C 冷水槽中 90 分鐘之溶血處理，再以 7,000 rpm，30 分鐘低溫遠心洗滌三次，收集沉澱物，加入 10 倍量磷酸緩衝液，以低速 5 分鐘之磨碎機磨細均質，經 1,000 rpm，5 分鐘之低速遠心取上清液，再以 10,000 rpm，30 分鐘低溫遠心洗滌二次，沉渣加入 10 倍量之磷酸緩衝液，5 分鐘之再磨細均質之，以 3,000 rpm，15 分鐘遠心之上清液，再經 10,000 rpm，30 分鐘之遠心，沉渣加入 10 倍量磷酸緩衝液浮游後，以 20 Kc，10 分鐘之超音波處理，再經 5,000 rpm，15 分鐘遠心，取上

清液，加入 1 : 10,000 倍量的防腐劑 thimerosal 即成 CF 抗原，置 4°C 保存備用。另由日本農林水產省家畜衛生試驗場南哲郎博士贈予之 *A. marginale* 標準血清及 CF 抗原供為對照用。

2. 補體結合反應術式：係上述試製之 CF 抗原，經與 *A. marginale* 標準血清行 box-titration 後，取 2 單位之稀釋倍 CF 抗原備用，依 Mahoney<sup>(21)</sup> 及 Minami 等<sup>(22)</sup> 之方法，即 0.025 ml 經稀釋之受檢血清；0.025 ml 之 2 單位抗原；0.05 ml 2 單位補體，混合均勻後，置於 4°C，經 16~20 小時之冷溫感作，翌日取出，於 25°C 之室溫置放 10 分鐘後，再加入 0.05 ml 溶血系（2 單位之溶血素加入等量之 2% 綿羊血球液），經振盪混合，置於 37°C 含濕箱內反應 30 分鐘，經 1,000~2,000 rpm，10 分鐘遠心，再行判讀，血清 1 : 3 以上呈 75% 以上阻止溶血者為陽性反應例。

五. 免疫用抗原製作及野外牛隻免疫：

1. 免疫抗原：將 *A. marginale* 人工感染牛之感染血液，經遠心濃縮之血球，一部份依 Timms 等<sup>(18)</sup> (1981) 法，加入等量牛血清葡萄糖磷酸緩衝液（即 PH 7.2 PBS 中含 10% 健康牛血清及 2.7% glucose）製成活性免疫抗原；另一部份，依 Goodger 等<sup>(19)</sup> (1983) 法，經 0.35% 生理食鹽水溶液於 4~10°C 以冷水槽中，90 分鐘之溶血處理，再以 7,000 rpm，30 分鐘低溫遠心，收集沉澱物，加入 10 倍量之磷酸緩衝液後，以 0.2% 戊二醛 glutaraldehyde (Sigma) 於 37°C，一小時之感作，使 *A. marginale* 不活化，然後加入葡聚糖 DEAE-Dextran (Pharmacia) 約為 100 mg/ml，製成不活化免疫抗原。

2. 野外牛隻免疫試驗：新竹縣轄內酪農戶之 A 牧場之 12 頭牛隻中之 10 頭接種試製之 *A. marginale* 不活化免疫抗原，每頭一劑量 4 ml 皮下接種，剩餘 2 頭未接種供做對照。B 牧場 22 頭牛隻中 20 頭接種試製 *A. marginale* 活性免疫抗原，每頭一劑量 4 ml 皮下接種，剩餘 2 頭未接種供做對照。

供試牛隻經免疫抗原接種後、定期採血、檢查 *A. marginale*、量體溫、臨床症狀之觀察及採取血清測定血中 *A. marginale* 之 CF 抗體消長，以評估不活化及活性免疫抗原對田間牛群之免疫效果。

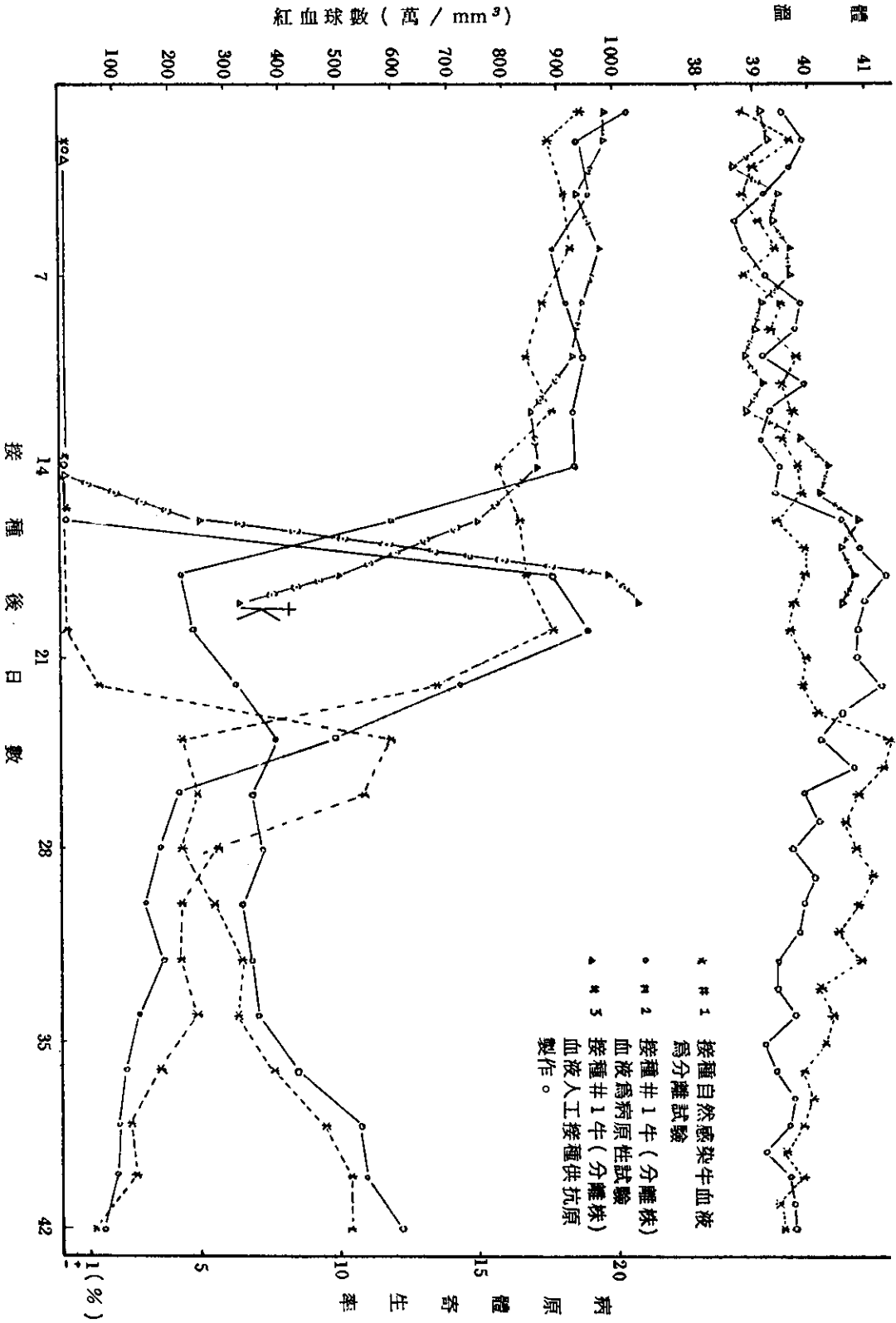
## 試驗結果

一. *A. marginale* 之分離及其病原性：

將台北縣轄本症疑患牛隻之脫纖血液接種 #1 摘脾仔牛，如圖一，於接種後第 24 天，體溫上升 41.4°C，紅血球由正常值 (700 萬/mm<sup>3</sup> 以上) 下降至 220 萬/mm<sup>3</sup> 左右，同時血中 *A. marginale* 也達 12% 之寄生率，供試牛之食慾逐漸減退，消瘦、倦怠及輕度黃疸與貧血等臨床症狀，經 32 天體溫恢復正常，紅血球數也逐漸恢復，上升至 500 萬/mm<sup>3</sup> 以上，而血中 *A. marginale* 却漸消失。將分離株 (#1 牛接種後第 26 天採得之脫纖血液) 再次接種 #2 摘脾仔牛，究明其病原性，結果於接種後第 16 天體溫開始上升至 40.5°C，且呈稽留熱型；紅血球初見下降至 600 萬/mm<sup>3</sup>，至第 18 天則降至 220 萬/mm<sup>3</sup>，至第 24 天回升至 390 萬/mm<sup>3</sup>，第 38 天始上升至 540 萬/mm<sup>3</sup> 以上，血中 *A. marginale* 於第 18 天達 17% 左右，第 20 天達 19% 最高峯，第 26 天之後逐漸降低。臨床症狀上大致與 #1 呈相同程度與病程而耐過，惟其對摘脾仔牛之發症稍見提前約 6~7 天。另就 #1 及 #2 牛於第 28 天採得之血清經與標準 CF 抗原 (日製) 反應，呈 40 倍之 CF 反應，及依血液塗抹片，血球內小體之形態，鑑定為 *A. marginale*，如圖二所示。

三. 試製 *A. marginale* 補體結合抗原及野外例抗體之測定：

製成之 *A. marginale* CF 抗原，經與本病之陽性血清行 box-titration 之結果，俱有 16 倍之補體結合抗原力價，就此抗原與日製抗原之 2 單位對同一陽性及陰性血清反應試驗，結果如表一所示，即試製與日製抗原對陽性或陰性血清反應力價一致，證實試製之 *A. marginale* CF 抗原俱有高度之特異性。



圖一 台灣 *A. marginale* 之分離及該分離株對摘脾仔牛之病原性試驗  
*A. marginale* 寄生率、臨床症狀 (紅血球體溫) 之變化

表一 試製 *A. marginale* CF 抗原之特異性反應

	試製 AM-CF 抗原	日製 AM-CF 抗原	台製 BB-CF 抗原
AM 陽性血清	64	64	≤ 4
BB 陽性血清	≤ 4	≤ 4	128
正常牛隻血清	≤ 4	≤ 4	≤ 4

註：AM 即 *A. marginale*；

BB 即 *B. bigimina*

另由台北縣轄內某本症發生牧場，採得之檢體，以試製之 CF 抗原測得結果，如表二所示，由 5 頭俱有臨床症狀之牛隻測得之 CF 抗原，皆呈陽性反應，且有高達 64 倍者；無臨床症狀外觀健康牛隻，8 頭中有 6 頭呈陽性反應。且試製與日製 CF 抗原所測得之結果一致，顯示試製 *A. marginale* CF 抗原之抗原性不錯。

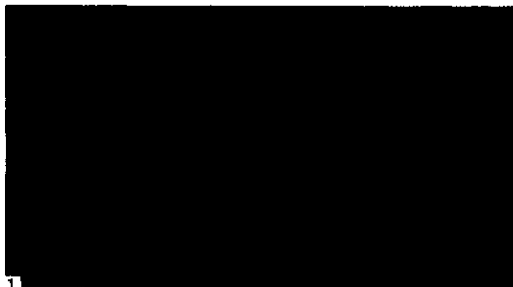
表二 試製 *A. marginale* CF 抗原對野外自然感染牛隻抗體測定

牛隻	號碼	試製抗原 (抗體價)	日製抗原 (抗體價)
有感染症狀之牛	214	16	16
	217	32	32
	221	16	16
	236	64	64
	267	32	32
無健康症狀之外表	271	8	8
	293	≤ 4	≤ 4
	296	16	16
	312	8	8
	314	16	16
	325	32	32
	334	≤ 4	≤ 4
	343	8	8

就試製之 *A. marginale* CF 抗原，對由苗栗以北等四縣轄內酪農戶牛群採得之血清，施予抗體測定，以瞭解台灣當前本症之概況，如表三所示，台北縣最高達 82.5% (33 / 40)，苗栗縣較低，但仍高達 47.5% (21 / 40)；就抗體價而言，陽性率高的地區，牛隻所持有之抗體價也較高，如台北、新竹等縣，顯示本症之發生頻率仍與抗體價之高低有密切的關係。

表三 台灣北部地區酪牛 *A. marginale* CF 抗體概況

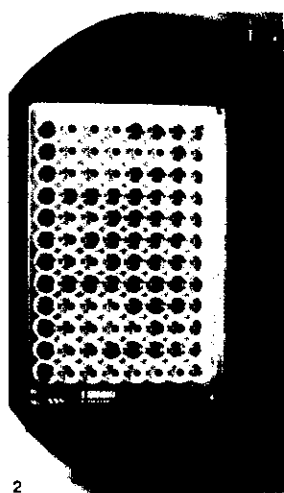
縣別	檢體數	血中 <i>A. marginale</i> CF 抗體							百分率 (%)
		< 4	4	8	16	32	64	128	
台北	40	7	5	3	11	10	3	1	82.5
桃園	60	26	9	13	7	5			56.6
新竹	40	9	6	8	8	7	2		77.5
苗栗	40	21	9	8	1	1			47.5



圖二：台灣分離之牛立克次體症（邊蟲症）病原體 *A. marginale*，箭頭所指，在紅血球之邊緣，呈圓形。

依微量補體結合反應法，於抗原、抗體及溶血系經感作後，再以 1,000 ~ 2,000 rpm 之遠心，再行判讀，可得清晰之反應，如圖三所示。

三、試製 *A. marginale* 免疫抗原對野外牛隻之免疫：



圖三：應用 *A. marginale* 補體結合反應法對牛立克次體症（邊蟲症）田間疫情調查實例；H行爲 4 倍稀釋受檢血清之對照（無含抗原）G行起爲 4~256 倍血清稀釋倍數；No 4, 8 爲陰性反應，其餘皆爲陽性反應。

1. 不活化免疫抗原之免疫：試製 *A. marginale* 經 glutaraldehyde 不活化之免疫抗原，對 0.5~1.5 歲齡之免疫，結果如表四所示，該抗原對任何接種牛隻皆無不良反應，CF 抗體價，約於第二週即可產生（就試前 CF 抗體陰性牛而言）4 倍 CF 抗體價，但原有 CF 抗體陽性牛，經抗原接種後，反呈陰性反應，且該不活化抗原所產生之 CF 抗體之持續性微弱，至第 16 週即見消失。
2. 活性抗原之免疫：經濃縮製成之活性免疫抗原對 0.5 歲及 1.5 歲以上乳牛之接種，僅見 0.5 歲齡組 8 頭中之 2 頭呈輕度之熱反應外，其他牛隻皆無任何不良反應及本症特有之臨床症狀，逐週採血塗抹鏡檢血球內之 *A. marginale*，部份小乳牛可於第 4 週檢出；但血中 *A. marginale* CF 抗體則第 16 週皆全例呈陽性反應，如表五所示。

就 *A. marginale* 活性及不活化免疫抗原對 0.5 齡小乳牛及 1.5 年齡牛接種後，血中 *A. marginale* CF 抗體之比較，顯示活性抗原較不活化抗原之持續性長且抗體力價也高，如圖四所示。

表四 *A. marginale* 不活化免疫抗原對野外牛隻之免疫

年 齡	號 碼	臨床 a 症狀	血中 <i>A. marginale</i> 病原體 b						CF 抗體價 c					
			0	1	2	4	8	16 (週)	0	1	2	4	8	16 (週)
1.5 歲	1	—	—	—	—	—	—	—	—	4	8	4	—	
	2	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	4	—	
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8	8	4	
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	—	
	5	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	4	—	
0.5 歲	6	—	—	—	—	—	—	—	—	8	4	—	—	
	7	—	—	—	—	—	—	4	—	—	—	4	—	
	8	—	—	—	—	—	—	4	4	—	—	—	—	
	9	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4	—	—	
0.5 歲	10	—	—	—	—	—	—	—	—	4	8	4	—	
	11	—	—	—	—	—	—	4	4	4	4	—	4	
	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

註：(A) —：表示一切正常。

(B) —： *A. marginale* 陰性。

(C) — 即 4 倍血清稀釋倍於 25% 以上呈溶血反應。

數字爲血清稀釋倍於 75% 以上呈阻止溶血反應。

表五 *A. marginale* 活性免疫抗原對野外牛隻之免疫

年 齡	號 碼	臨床 a 症狀	血中 <i>A. marginale</i> 病原體 b					CF 抗 體 價						
			0	1	2	4	8	16 (週)	0	1	2	4	8	16 (週)
1.5 歲 以 上	21	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	8	4	4
	22	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	4	8	4
	23	—	—	—	—	±	—	±	—	—	—	—	4	8
	24	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	4	8
	25	—	—	—	—	—	—	—	8	8	4	8	8	4
	26	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	8	8
	27	—	—	—	—	—	—	—	4	4	4	8	8	4
	28	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	4	4
	29	—	—	—	—	—	—	—	8	8	4	4	4	4
	30	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	8	8
	31	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	4	8
	32	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	8	8	4
0.5 歲	33	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	4	8	16
	34	±	—	—	—	±	±	+	—	—	—	8	8	16
	35	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	8	4	4
	36	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	4	4
	37	±	—	—	—	±	±	+	—	—	—	8	8	16
	38	—	—	—	—	—	—	—	4	4	8	4	4	4
	39	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	8	4	4
	40	—	—	—	—	±	—	—	4	4	4	4	4	4
0.5 月 齡	41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

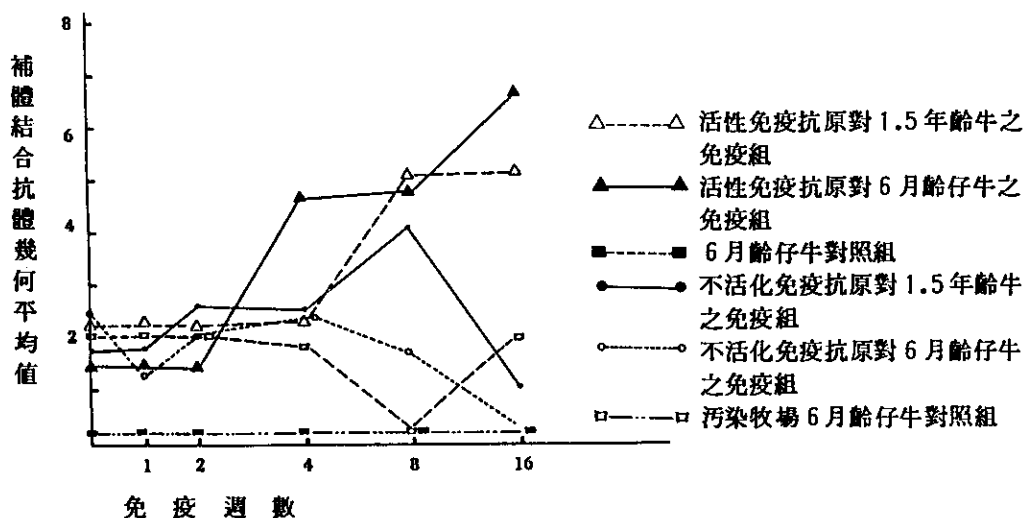
註：a：—表示一切正常，±表示體溫微上升（40～40.3℃）

b：—表示 *A. marginale* 陰性

±表示 *A. marginale* 於 10 視野有 5 個以上

十表示 *A. marginale* 於 100 視野下有 10 個左右

±表示 *A. marginale* 於 100 視野中可檢出 1 個

圖四 *A. marginale* 活性及不活化免疫抗原對野外牛隻免疫抗體之消長

## 討 論

台灣牛立克次體症，自張氏等<sup>(21)</sup> (1966)、Otte氏<sup>(22)</sup> (1968)及 Fölsch氏<sup>(9)</sup> (1969)依發生學、血液學及血清診斷學證實以來，迄今已近二十年之久，但病原體仍尚未被分離，且當前住血微生物已趨複雜，隨著牛隻飼養頭數遽增，發生例也相形增加，但防治措施上未能把握時機，效果不彰，致遭無謂損失頗鉅，本次由台北縣轄內疑患本症牛群中，初步分離成功，依形態學及血清診斷學之反應，鑑定為 *A. marginale*。在牛 *Anaplasma* 屬中有 *A. marginale* 及 *A. centrale* 兩種，前者之病原性較強，常致感染牛重症斃死，就本次分離之 *A. marginale* 再次接種摘脾仔牛，究明其病原性，僅致體溫上升、紅血球數下降、食慾減退、倦怠、輕度黃疸、貧血，但最後仍呈慢性病程而耐過，顯示該分離株之病原性不強，惟其對供試牛之發病期稍見提前約一週，此或許須經牛隻通過數代後，毒力方能恢復，抑是由於未經媒介昆蟲體內之發育環再回復至牛體內，因而顯現較弱毒力，實值探討。但若為一弱毒株，更有利於將來活性免疫抗原之開發。另除本次分離之 *A. marginale* 種外，其他 *A. centrale* 種及在 *Rickettsiales* 日中同屬 *Anaplasmataceae* 科之另一 *Eperythrozoon* 屬，其對牛隻引起之徵候也極相似，在臨床診斷上仍有誤診之虞，故台灣牛群是否尚有該某住血微生物之存在，實有繼續探查的必要。

將試製、日製之 *A. marginale* CF 抗原，與標準抗血清、野外自然感染例牛血清之比較反應試驗，所得成績皆一致，顯示其特异性相當高，就該 CF 抗原對苗栗以北縣轄內酪農戶牛群之抗體調查，得高達 47.5% 以上之陽性率，顯示北部地區確實已嚴重感染 *A. marginale*，此或許與飼養方式有關，因台灣北部地區乳牛大都牧放於山坡地草原上，而媒介昆蟲因生息於斯，其與草原息息相關，由於媒介昆蟲之傳播病原，使牛隻感染，致陽性率偏高。又陽性率高的地區，牛隻血中特有的 *A. marginale* CF 抗體價也偏高，此可能為

該牧場潛在着病原體，使牛隻呈持續性感染，所以本症之發生頻率也就與抗體價之高低有密切的關係，因此藉此血清學診斷法，可瞭解本症之疫情，提供情報，對本症之防治仍有其應用的價值。

就分離之 *A. marginale* 再以人工接種摘脾牛，取得之感染血液，依 Goodger 等<sup>(10)</sup> (1983) 及 Timms 等<sup>(25)</sup> (1981) 法製成不活化及活性免疫抗原，對野外牛隻免疫試驗，顯示不活化免疫抗原，雖極俱安全性，但免疫抗體之產生不甚理想；Brock 等<sup>(7)</sup> (1965)，Jones & Brock<sup>(23)</sup> (1966)，Zaraza & Kuttler<sup>(20)</sup> (1971) 曾將 *A. marginale* 感染牛血，去除血球之原生質及胞膜，取得之抗原性物質，經凍結乾燥後加入油性佐劑製成不活化免疫抗原、免疫牛隻，就 CF 抗體之產生與對照牛有顯着的差異，且僅能減輕病程而已；McHardy & Simpson<sup>(20)</sup> (1973) 將 *A. marginale* 經超音波處理與含有 2.5 mg / dose 之皂素 saponin 佐劑製成的不活化免疫抗原，其對牛隻之免疫，也僅能延遲發生及減輕病症而已，其實際效益不大。此為本次試驗所證實，所以筆者認為不活化免疫抗原之發展，有待再次之研究探測。活性免疫抗原接種之野外牛隻，僅見少數呈輕度 40 ~ 40.3°C 之體溫上升而已，顯示其安全性仍不錯，此可再次證實供製免疫抗原之 *A. marginale* 台灣分離株之毒力不強，將來或許可為製作免疫抗原之原株。就抗體產生而言，至第 16 週全例牛隻皆呈陽性反應，且有高達 16 倍以上者，顯示該活性免疫抗原的效果；Ristic 等<sup>(24)</sup> (1969)，Osorno 等<sup>(22)</sup> (1975)，德久氏<sup>(4)</sup> (1976)，Corrier 等<sup>(8)</sup> (1980)，Vizcaino 等<sup>(27)</sup> (1980) 及 Henry 等<sup>(11)</sup> (1983) 等將 *A. marginale* 通過山羊或綿羊使之馴化，其對牛隻之毒力消失，製成活性免疫抗原，對野外牛群免疫，皆可產生 *A. marginale* CF 抗體，且於野外強毒暴露環境下可耐過，此已被吾等本次試驗所證實，雖吾等試驗牛隻，未經強毒株再接種之攻擊，但這些牛隻仍飼養於本症高度污染牧場者，試驗期間內却未見發症，而與其相鄰之牧場牛隻反有發生例，足證試製



免疫抗原俱有免疫效果。惟吾等之毒株未經山羊或綿羊之馴化滅毒，是否有毒力復歸之虞，仍待來日之探討。又Kuttler<sup>(16)</sup> (1967)之依 *A. centrale* 之交叉免疫法，以抵抗 *A. marginale*，仍為將來所探試的。

Trueblood & Bear<sup>(26)</sup> (1973)及 Hirdaligo<sup>(12)</sup> (1975)曾試將純化之 *A. marginale* 維持於含有葡聚醣之細胞培養液的牛淋巴結內，經螢光抗體法證明可在該淋巴結細胞中生存7天之久，首創於試管內培養 *A. marginale* 之新技；Marble & Hanks<sup>(18-19)</sup> (1973)將 *A. marginale* 以家兔骨髓細胞培養，可使之維持140天之生命，且對接種牛隻可產生4倍的CF抗體；Kessler等<sup>(16)</sup> (1979)，Kessler & Ristic<sup>(14)</sup> (1979)進一步將 *A. marginale* 感染牛血液，經去除血漿及血沉棕黃層，所得純感染 *A. marginale* 紅血球，以RPMI 1640培養，終獲成功；故引用細胞培養法以期增殖 *A. marginale* 製成活性免疫抗原，對因直接由牛或羊動物感染血液製成之抗原，常有夾帶其他病原性微生物感染之虞，將可迎刃而解。其他，又如免疫抗原，僅能於短時間內使用，未能久存，在使用上極為不便，為使其有效期延長，達成免疫抗原之較廣泛應用起見，超低溫保存法；及如依Timms等<sup>(25)</sup> (1981)之將 *B. bovis*，*B. bigimina* 及 *A. centrale* 混合製成之活性多元化免疫抗原等，其實際使用價值之探討種種問題，將是吾等將來繼續研究發展的重要課題。

### 誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會75農建一7.1—牧16(3)之經費補助；台北、桃園、新竹及苗栗縣家畜疾病防治所之協助採樣；日本農林水產省家畜衛生試驗場，前九州支場室長藤永 徹博士，本場室生蟲研究室長南 哲郎博士之提供寶貴研究資料；本所邱所長住炎博士，陳主任忠松先生之殷切指導與鼓勵，本生物藥品檢定室劉敏主、彭衍初及洪煥堂先生之協助，得以順利完成，謹併誌萬分之謝忱。

### 參 考 文 獻

1. 張政宏、何聰明、歐特 1966：台灣牛焦蟲病之調查。國立台灣大學農學院研究報告，9(1)：79～85。
2. 蘇杰夫、劉敏主、陳忠松、彭衍初、洪煥堂、彭少雄、黎俊輝、張南驥、林本欽 1984：牛焦蟲、邊蟲病之診斷及免疫：牛焦蟲病之免疫及邊蟲病抗體調查、病原分離。七十四年度農委會補助計畫牛疾病調查防治研究試驗總報告。19～36。
3. 南 哲郎 1967：アナプラズマ病。家衛年報。116～122。
4. 德久 修一 1976：牛の寄生蟲病の血清學的診斷法ならびに予防ワクチンの開發に關する研究。研究成果83。農林水產省技術會議事務局。東京。
5. 藤永 徹 1984：私人信函。
6. 濱崎 和人、守野 繁、入來 理、作間みすみ、高松 市藏、林原 宏、富永 真人 1986：豪州産肥育用素牛にみられたアナプラズマ病の摘發事例2件について。獸醫畜産新報。783：649～652。
7. Brock, W.E., Kliwer, I.O. & Pearson, C.C. 1965: A vaccine for Anaplasmosis. J.A.V.M.A. 147:948-951.
8. Corrier, D.E., Vizcaino, O., Carson, C.A., Ristie, M., Kuttler K.L., Treviño, G.S. & Lee, A.J. 1980: Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: An examination of postvaccinal effects. Am. J. Vet. Res. 41:1062-1065.
9. Fölsch, D.W. 1970: Surrey on anaplasma-like bodies in small and large ruminants in three

- areas of Taiwan. Taiwan Jour. Vet. Med. Amin. Husb. 7:49-56.
10. Goodger, B.V., Wright, I.G. & Waltisbahl, D.J. 1983: The lysate from bovine erythrocytes infected with *B. bovis*. analysis of antigens and a report on their immunogenicity when polymerized with glutaraldehyde. *Zeitschrift für parasitenkunde* 69(4): 473-483.
  11. Henry, E.T., Norman, B.B., Fly, D.E., Wichmann, R.W. & York, S.M. 1983: Effects and use of a modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J.A.V.M.A.* 183: 66-69.
  12. Hidalgo, R.J. 1975: Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 36: 35-640.
  13. Jones, E.W. & Brock, W.E. 1966: Bovine anaplasmosis: its diagnosis, treatment and control. *J.A.V.M.A.* 149: 1624-1633.
  14. Kessler, R. & Ristic, M. 1979: In vitro cultivation of *Anaplasma marginale*: Invasion of and development in noninfected erythrocytes. *Am. J. Vet. Res.* 40:1774-1776.
  15. Kessler, R., Ristic, M., Carson, C.A. & Sells, D.M. 1979: In vitro cultivation of *Anaplasma marginale*: Growth pattern and morphologic appearance. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1767-1773.
  16. Kuttler, K.L. 1967: A study of the immunological relationship of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *Res. Vet. Sci.* 8: 467-471.
  17. Mahoney, D.F. (1967): Bovine babesiosis: Preparation and assessment of complement-fixing antigen. *Exp. Parasitol.* 20: 232-241.
  18. Marble, D.W. & Hanks, M.A. 1973: Anaplasmosis in primary rabbit bone marrow cells. In *Proceedings, Nat. Res. conf. on Anaplasmosis.* 49-50.
  19. Marble, D.W. & Hanks, M.A. 1973: *A. marginale* grown in stable rabbit bone marrow cells. In *Proceedings, Natl. Res. Conf. on Anaplasmosis.* 53-54.
  20. McHardy, N. & Simpson, R.M. 1973: Attempts cattle against anaplasmosis using a killed vaccine. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 5: 166-173.
  21. Minami, T., Yamake, K., Hayashi, S. & Ishihara, T. 1979: Serological relationship of a Japanese *Babesia* species and *B. bigemina* by the complement-fixation and capillary-tube agglutination tests. *Vet. Parasitology.* 5: 29-38.
  22. Osorno, M.B., Solana, P.M., Perez, J.M. & AgEng, T.R. L. 1975: Study of an attenuated *Anaplasma marginale* vaccine in Mexico-natural challenge of immunity in an

- enzootic area. *Am. J. Vet. Res.* 36: 631-640.
23. Otte, E. 1968: Anaplasmosis in Taiwan. *Taiwan Jour. Vet. Med. Anim. Husb.* 12: 23-36.
24. Ristic, M., Sibinovic, S. & Welter, C.J. 1969: An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. In *Proceedings 72 Annu. Meeting US Livestock San Assn, new Orleans L.A.* 1968: 56-69.
25. Timms, P.M., McGregor, W & Dalgliesh, R.J. 1981: Tick fever vaccine how they made and how to use them. *Queenslan. Agr. Jour.* 311-317.
26. Trueblood, M.S. & Bear, P.D. 1973: Cultivation of *Anaplasma marginale*. In *Proceedings. 6th. Natl. Anaplasmosis conf. Las Vegas, NV.* 54-58.
27. Vizcaino, O., Carrier, D.E., Terry, M.K., Carson, C.A., Lee, A.J., Kuttler, K.L., Ristic, M. & Treviño, G.S. 1980: Comparison of three methods of immunization against bovine Anaplasmosis: Evaluation of protection afforded against field challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1066-1068.
28. Zaraza, H. & Kuttler, K.L. 1971: Comparative efficacy of different immunization systems against anaplasmosis. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 3: 77-82.

## Production and application of antigens used for both complement-fixation test and vaccination to Rickettsiales isolated in Taiwan

Su Jei-fu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

Rickettsiales were isolated from the splenectomized normal cattle after an inoculation of the sample blood of a suspected Rickettsialous cattle in Taipei Hsien.

The blood obtained from the inoculated cattle was again used to inoculated cattle showed fever (40-41°C), joundice and anemia. The numbers of red blood cells (RBC) dropped down to below 3 millions/ml followed by weakness and emaciation. This pathrogen was identified in the Anaplasma marginale (A. marginale) based on it's morphology in RBC and serological test.

The blood collected from the inoculated cattle were lysed and the parasited were collected. antigen for complement-fixation stst were prepared by sonication of pathogens several times.

Specificity of the prepared antigen were high when the antigen was test by the comparison of it's reaction to both standard serum and serum from natural infected cattle.

The pathogens were collected from the blood of experimental inoculation of splenectomized cattle with A. marginale and conentrated by centrifugation when the concentration of pathogens were  $10^4$ - $10^5$ /ml in the blood. To part of concentrated pathogens the phosphate buffered glucose with 10% normal bovine serum was added and the living immunogen was made. In the other hand the inactivated immunogen was prepared by adding DEAE-dextran into the rest part of pathogens inactivated by glutaraldehyde. Either one of immunogens prepared in this manner was used to immunize 6 month-and/or 1.5-year-old cattle. The results indicated that the living immunogen has a superior capacity of producing CF antibody to that of inactivated immunogen as well as the CF antibody manitained longer.