

猪弓蟲病 Glutaraldehyde 固定乾燥血球抗原之 研製及應用

廖述吉、鄭建盛、楊揚輝

以 Glutaraldehyde 固定綿羊紅血球及附抗原而試製成之猪弓蟲病診斷用抗原，經與 Bis-Diazo-Benzidine 處理之抗原及單寧酸處理之相比較其凝血球集力價並無顯著性之差異。3種抗原同時應用於母猪（200頭及肉猪279頭）弓蟲抗體之檢查，其敏感性及特異性均無顯著性之差異。用 Glutaraldehyde 處理感作綿羊血球製成之抗原製造簡單而迅速，而且成品可以 4°C 處存放 1 年以上。

緒 言

目前本省養猪事業極倡盛，不論在疾病防治上與生產數量均有顯著的進步及增加，爲了確保養猪事業的成功，必須防止傳染病蔓延，本省猪病除了猪瘟以外最常見的是猪弓蟲病，本病病情劇烈，斃死率很高，耐過猪隻成爲不顯性感染，能成爲感染源。猪弓蟲病之診斷過去以單寧酸法及 B. D. B 法行血球凝集反應^{1,2,3,4,5}）試驗，及另外以補體結合反應與 Dye Test^{6,7}）。單寧酸處理抗原及 B. D. B 抗原因製造操作複雜，保存性亦不理想，成本上很昂貴。而色素反應法又不方便，爲使臨床上大量早期診斷，必須有便宜而易保存之抗原供用，筆者針對此而發現出用 Glutaraldehyde 固定感作綿羊血球抗原。茲將該項抗原製造之有關試驗成績報告於後。

材料與方法

1. 供試弓蟲（原蟲）株：

係 R. H 株，由日本農林水產省動物醫藥品檢查所分讓。

2. 小白鼠：

爲本所飼養或向動物商購進，體重18~20公克作抗原製造用。

3. 綿羊：向外購進，體重約30公斤。

4. 毛猪：係向外購進，體重約 20kg，田間試驗用猪隻爲宜蘭縣種母猪場及肉成猪場抽檢猪隻。各種抗原及感作血球等製作之程序。¹⁾。

（1）水劑抗原製作方法

R. H 株接種於小白鼠腹腔內（56,000個/0.1ml），發病後抽取腹水遠心→取沈渣→以生理食鹽水加入洗滌遠心→取沈渣→洗滌3次→採集 T. P 原蟲→再加與腹水等量之冷蒸餾水→用乾冰急速凍結，隨後於流水中融解，如此反復操作8次以上→置於 4°C 之冰箱一夜→遠心（3,000r. p. m）並除去沈渣物→上清液即粗抗原→再經精製→純精抗原→測定力

價。

(2) 單寧酸處理抗原製作方法

a. 單寧酸處理血球液之配製

以 P. B. S (P. H72) 配成 3% 綿羊血球液 (洗淨過) → 取 1ml 再加 ×10 萬倍單寧酸液 1.0ml, 在 0°C 處振盪反應 15 分鐘, → 遠心 (2,000r. p. m) 10 分鐘 → 上清去除, → 沈渣加入等量之 P. B. S (P. H7.2) → 洗滌遠心 (2,000r. p. m) 如此反復 3 次上清去除 → 沈渣血球以冷卻生理食鹽水加入 1.0ml, 成浮游液, 浸漬於冰水中備用。

b. 抗原感作血球液之製作

以 P. B. S (P. H6.4) 4ml, → 加入上項單寧酸處理血球液 1ml, → 再加入以生理食鹽水配成之 2 倍之抗原液 1ml, 置於 37°C 溜槽中振盪感作 15 分鐘 → 遠心 (2,000r. p. m) 15 分 → 上清去除, 沈渣血球再以 P. B. S (P. H 7.2) 配成之 2% N. SS 洗滌 2 次, 然後沈渣血球以 P. B. S (P. H7.2) 配成之 2% N. SS 液加 1ml 成浮游液, 置於冰水中備用 (反應液), 即成單寧酸處理血球抗原液。

(3) Glutaraldehyde 處理抗原製作方法

a) 綿羊血球之固定

採取綿羊血液, 用 P. B. G. 液洗滌 4 次, 配成 20% 血球液, → 加入等量之 0.2% Glutaraldehyde P. B. G 液, 置於 37°C 定溫水槽中感作 15 分鐘 → 再用 0.85% 生理鹽水洗滌 5 次 → 沈澱血球用 0.1% Sodium azide Saline 配成 10% 血球浮游液置於 5°C 處保存。

b) 綿羊血球液之感作

取 5ml 之 20% 固定血球液加入 2ml 之弓蟲抗原液置於 37°C 之定溫水槽中感作 16 ~ 18 小時, → 用 P. B. S (P. H7.0) 洗滌 3 次 → 沈澱紅血球加媒劑凍結乾燥後再採樣作力價測定。

c) 乾燥抗原之使用

經凍結真空乾燥血球抗原 → 加入附屬的懸沈用液 4ml 完全溶解後移到遠心管 → 靜置約一小時 → 再度攪拌 → 遠心 2,000r. p. m 5 分鐘 → 去除上清液 → 沈澱物加入殘餘之 46ml 之懸濁液使之均勻浮游 → 加入 0.01% 之 Sodium azide 使保存性佳良。

(4) 試製 Glutaraldehyde 抗原與他種抗原作 H. A 反應比較試驗

a)、供試豬隻係本所弓蟲病人工免疫豬 3 隻及 1 隻 S. P. F. 仔豬作試驗對照組, 以及田間試驗豬隻種母猪 200 頭, 肉成豬 279 頭。臺製抗原組, 日製 B. D. B 組, 單寧酸處理抗原組, 行效力比較試驗。

b) 供試反應血清: 係從供試豬頸靜脈採血並將血清分離, 經 56°C 分鐘非働化。採血同時用 No. 27 東洋濾紙 (採血用) 吸收待風乾後供試。

c) 血球凝集試驗: 依佐藤法施行 HA 試驗¹⁾, B. D. B 抗原及 glutaraldehyde 處理抗原之血清試驗簡述如下:

將吸血紙剪碎加 0.6cc S. E. S (等於血清稀釋倍數 16 倍) 以後依次稀釋為 ×64, ×256, ×1024, ×4096, 於 37°C 孵卵器內感作 3 小時後移室溫靜置一夜判定。

單寧酸處理血球抗原之血清試驗則將被檢血清用 P. B. S (P. H 7.2) 加成 2% 之 N. S. S 依次稀釋 ×4, ×16, ×64, ×256, ×1024, ×4096 倍後再加單寧酸處理血球抗原液每孔 0.05ml, 振盪使之混勻後置於 37°C 孵卵器內感作 3 小時後移室溫靜置一夜判定。

試驗結果

自製 Glutaraldehyde 感作血球乾燥抗原與單寧酸處理血球抗原及日製 B. D. B 抗原之 H. A 反應比較試驗。

1. 對於本所人工免疫豬與 S. P. F 豬血清之測定試驗：

將以人工感染弓蟲耐過之陽性豬隻(35—45台斤)與陰性豬隻 S. P. F 仔豬) 作分組試驗，分單寧酸處理抗原組與日製 B. D. B 組及臺製 Glutaraldehyde 感作組行效力比較試驗。結果如下表 1

表 1 人工免疫與 S. P. F. 豬血清 H. A 試驗成績

豬 號 碼	單寧酸處理血球抗原	日製 B. D. B 抗原	Glutaraldehyde 感作血球抗原	
			Lot I	Lot II
# 1 (陽性)	× 64	× 64	× 16	× 16
# 2 (陽性)	× 256	× 256	× 256	× 256
# 3 (陽性)	× 1,024	× 1,024	× 1,024	× 1,024
# 4 (S. P. F. 仔豬)	—	—	—	—

單寧酸處理抗原使用 2H. A 單位價。

2. 對於種母猪血清之測定試驗：

由宜蘭縣家畜疾病防治所在各鄉鎮隨機抽取種母猪血清(濾紙吸着者)共 200頭，分組以單寧酸處理血球抗原，與日製 B. D. B 抗原，及自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原行 H. A 反應比較試驗，結果如下表 2。

表 2 種母猪血清(濾紙法) H. A 反應試驗成績

組 別	供 試 頭 數	H. A 價 成 績					判定之百分率	
		≤16	64	256	1,024	4,096	陽 性	陰 性
單寧酸處理抗原	200頭	181	0	0	12	7	9.5	90.5
日製 B. D. B 抗原	200頭	181	0	0	12	7	9.5	90.5
自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原	200頭	188	0	8	3	1	6.0	94.0
對照組	陽性豬血清	1 頭	0	0	0	1	100	0
	S. P. F. 豬血清	1 頭	1	0	0	0	0	100

就種母猪200頭施行 H. A 測定試驗(濾紙法)結果單寧酸處理血球抗原與日製 B. D. B 抗原成績一致，其陽性率佔9.5%，陰性率佔90.5%。與自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原比較結果其陽性率佔6.0%，陰性率佔94.0%。經統計結果，單寧酸處理血球抗原，日製 B. D. B 抗原，自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原其效力均無顯著性之差異，(表 3)。

表 3、種母猪顯著性測定

H. A 試 驗	單寧酸處理血球抗原	日製 B. D. B. 抗原	自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原	總 計
陽 性	19	19	12	50
陰 性	181	181	188	550
總 計	200	200	200	600

統計結果 $X^2 = 1.7134 < X^2 \left(\frac{n-1}{P=0.05} \right) = 3.841$ 不顯著。

3. 對於肉成猪血清之測定試驗：

由宜蘭縣家畜疾病防治所在各鄉鎮隨機抽取肉成猪血清（用濾紙吸着者）共 279 頭，分組以單寧酸處理血球抗原，與日製 B. D. B 抗原，及臺製 Glutaraldehyde 感作血球抗原行 H. A 反應比較試驗，結果如下表四。

表 4、肉成猪血清（濾紙法）H. A 反應試驗成績

組 別	供 試 頭 數	H. A 價 成 績					判定之百分率	
		≤16	64	256	1024	4096	陽 性	陰 性
單寧酸處理抗原	279頭	270	0	0	7	2	3.2	96.8
日製 B. D. B. 抗原	279頭	270	0	0	7	2	3.2	96.8
自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原	279頭	272	0	4	2	1	2.58	97.42
對照組	陽性猪血清	1 頭	0	0	0	1	100	0
	S. P. F. 猪血清	1 頭	1	0	0	0	0	100

表 5、肉成猪顯著性測定

H. A 試 驗	單寧酸處理血球抗原	日製 B. D. B. 抗原	自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原	總 計
陽 性	9	9	7	25
陰 性	270	270	272	812
總 計	279	279	—	837

統計結果 $X^2 = 0.2574 \leq X^2_{(P < 0.05)} = 3.841$ 不顯著。(卡方)

肉成猪 279 頭施行 H. A 測定試驗結果，以單寧酸處理血球抗原，與日製 B. D. B 抗原成績一致。其陽性各佔 3.2%，陰性率各佔 96.8%，與自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原比較結果其陽性率佔 2.6%，陰性率佔 97.4%，經統計結果單寧酸處理血球抗原，日製 B. D. B 抗原，自製 Glutaraldehyde 感作血球抗原，其效力均無顯著性差異（表 4）。

4. 保存性試驗

將試製二批 (Lot I, Lot II) Glutaraldehyde 感作綿羊血球抗原置於冷室 (4°C) 保存。保存期間分 95 天，190 天，370 天，420 天，各組分別取出，以本所弓蟲病人工免疫猪血清（濾紙法）3 隻及 S. P. F 仔猪血清 1 隻作 H. A 反應結果如下表 6。

表 6、試製 Glutaraldehyde 感作綿羊血球抗原保存性試驗成績

試製批號	猪 號 碼	製 造 直 后	保 存 95 天	保 存 190 天	保 存 370 天	保 存 420 天
Lot 1.	# 1 (陽性猪)	×64	×64	×64	×64	×16
	# 2 (陽性猪)	×256	×256	×256	×256	×64
	# 3 (陽性猪)	×1,024	×1,024	×1,024	×1,024	×256
	# 4 (S. P. F.)	<×16	<16	<16	<16	<16

試製批號	豬 號 碼	製 造 直 右	保 存 95 天	保 存 190 天	保 存 370 天	保 存 420 天
Lot 2.	# 1 (陽性豬)	64	×64	×64	×64	×16
	# 2 (陽性豬)	256	×256	×256	×256	×64
	# 3 (陽性豬)	1,024	×1,024	×1,024	×1,024	×256
	# 4 (S. P. F. 仔豬)	<×16	<16	<16	<16	<16

製造道后，保存95天，保存190天，保存370天，及保存420天，等5組，以弓蟲 (R. H株) 人工免疫豬血清3隻(濾紙法)作 H. A 試驗，至於保存370天都顯示出其力價均無任何之變化或下降。

討 論

豬弓蟲病診斷用抗原，以前認為最理想，準確性高者有單寧酸處理綿羊血球抗原，B. D. B 固定乾燥血球抗原。^{1,2,3)} 這次筆者試製之 Glutaraldehyd⁴⁾ 感作綿羊血球抗原^{5,6)} 與單寧酸處理血球抗原及日製 B. D. B 抗原，作 H. A 比較試驗(種母豬200頭，肉成豬279頭)，試驗材料則以人工接種弓蟲免疫豬血清⁴⁾ 及 S. P. F 豬血清供試，成績均很理想。單寧酸處理血球抗原反應用血清是普通方法所分離的血清作試驗材料^{1,2)}，而 Glutaraldehyde 感作綿羊血球抗原則為從吸血紙浸透出的血清作試驗材料，^{1,2,3)} 故兩者血清量在操作時必須標準化，方能使血清稀釋倍數一致。在操作上 Glutau-aldehyde 感作綿羊血球抗原作 H. A 試驗時只須將成品適當稀釋即可應用，無須特殊技巧與設備，且用吸血紙採血即可進行，採血亦非常省時，準確性不低於單寧酸處理抗原及日製 B. D. B 抗原。B. D. B 抗原在操作上雖亦簡單，但抗原製造過程複雜而費時，製造成本相當昂貴，不易推廣應用。Gltaraldehyde 感作綿羊血球抗原，製造過程很簡單，只須2天即可完成，操作上亦簡單，在成本上極廉價，故易於推廣應用，此抗原不但安定性很好而且使用方法亦很簡單，不像單寧酸血球抗原操作之手續繁雜費時，且必須多適當設備才能進行，後者供檢血清量較多，採血工作亦比較費時，又不能長久保存缺點很多。而 B. D. B 抗原在操作上亦簡單，在成本上昂貴。

誌 謝

本試驗承蒙前日本家畜衛生試驗場，椿原彥吉博士提供寶貴資料及宜蘭家畜疾病防治所派員協助採樣，使本試驗得以順利完成，亦表示深沈謝意。

參 考 文 獻

1. 花木琢磨，信藤謙藏，佐藤卯三郎，Toxoplasma 血球凝集反應に於ける研究、第57回日本獸醫學會(第6部會) 47: 16~17 (1964)。
2. 信藤謙藏：豬 Toxoplasma 症の診斷，獸醫畜產新報283, 785—790及び284, 849—853 (1961)。
3. 信藤謙藏：Toxoplasma 症診斷，社團法人，日本動物藥事協會レリーズ 1—58 (1965)。
4. 上田春人：Toxoplasma の毒力及び免疫について慶應醫學第37卷第9號1631—1638 (1960)。
5. 廖述吉、楊敏雄：豬弓蟲病 B. D. B. (Bis-Diazo-Benzidine) 固定乾燥血球抗原之研製及應用試驗，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告第六期P. 75—80 (1969)。
6. 蘇杰夫、林地發、林榮福、邱朝齊、林再春、劉正義、林茂勇：1977·臺灣豬麥可菌病之研究，I 麥可菌種之分離固定及補體結合抗原之研製，中華民國獸醫學會雜誌，3；1—8。
7. Boulanger, P. and C. L'ecupen, 1968. Enzootic Pneumoniae of Pigs; Complement-fixation tests for the detection of mycoplasma antibodies in the serum of immunized rabbits and infected swine, Can. J. Comp. Med. Vet. Sic. 32; 547—554.

8. Holmgeu, N. 1974. An indirect hema-aggutination test for delection of antibodies against M. hyopneumoniae using formalin azide tanned swine erythrocytes, Res, Vet. Sie 16 ; 341—346.

The Production and Test of Toxoplasma Antigen for Diagnosis of Swine-Dried Glutaraldehyde Treated Sheep Erythrocyte Antigen

S. C. Liao, Jian-Sheng Cheng, Y. H. Yang

In this experiment, two batches of toxoplasma antigen were produced to diagnoze swine; 200 sows and 279 fattening pigs were tested. When the Japanese B. D. B. antigen is compared with tannic acid treated antigen, no significant difference was observed between the B. D. B. antigen and tannix acid treated antigen. The positive H. A. rates of the B. D. B. antigen were 9.5% for the sows and 3.2% for the fattening pigs; the positive H. A. rates of our antigen were 60% for sows and 2.58% for fattening pigs. According to these data, our glutaraldehyde treated antigen could diagnoze swine toxoplasma accurately. In addition, our antigen, could be stored at 4°C for at least 370 days without losing its antigenicity.