

台灣牛焦蟲病血清學診斷用抗原之研究

蘇杰夫¹ 鄭建盛¹ 廖述吉¹ 林本欽²

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 行政院農業發展委員會

由屏東地區某牧場之肉牛分離焦蟲病原蟲，仍屬 *Babesia*，將分離株再次人工感染牛隻，獲得之感染原蟲血液，以蒸餾水抽出法製成補體結合 (Complement-fixation; CF) 及依超音波處理所得之毛細管凝集 (Capillary-tube agglutination; CA) 等抗原，前者以第3～5次抽出之抗原較佳，且無抗補體現象，可達8倍之力價，後者較微弱，僅得2倍之凝集力價，經與野外感染牛隻血清比較試驗，前者測得陽性率為100% (10/10)，後者僅得60% (6/10)，顯示CF之敏感度較CA法為高。

牛焦蟲病係由住血孢子原蟲，經壁虱之媒介，吸取動物血液時感染引起的急性或慢性，致患者呈稽留熱型、貧血、黃疸及血紅素尿等特殊症候之傳染病，本病對各種家畜皆可發生，草食獸較多，尤其以反芻獸之被害更甚。引起本病重要孢子原蟲計有 *Babesiidae* 科之 *Babesia* 屬4種及 *Theileridae* 科之 *Theileria* 屬4種。本病發生於全球各地，但以熱帶、亞熱帶地區之發生較激烈，在台灣自1910年首由鳩野氏⁽¹⁾ 報告，隨後時有發生病例之報告，1941兒山氏⁽²⁾、1966張氏等⁽³⁾ 及1969張氏^(2,4) 先後證實本省發生之焦蟲病例中之孢子原蟲計有 *Babesia bigemina*，*Theileria* 屬及 *Anaplasma mrginale* 等。

本病之診斷雖可藉特殊之臨床症候及孢子原蟲之檢查，但經治療後或呈慢性經過，不顯性感染牛體內仍存有孢子原蟲，且本病在本省牛隻之發生亦趨複雜，僅藉此等方法予以診斷甚為困難，故對耐過牛隻之診斷，非靠動物接種不可，但該法既不經濟且費時間，又孢子原蟲之種別的鑑別同定不甚可靠，唯有血清學診斷法才是最理想之方法，目前之血清學診斷法，計有平芦等⁽⁵⁾ (1945)、Mahonoy⁽¹³⁻¹⁵⁾

(1962、1964、1967) 之補體結合試驗 (CF)、Ross & Löhr⁽¹⁶⁾ (1968) 及 Todorovic & Long⁽²⁰⁾ (1976) 之間接螢光抗體法 (IFA)、Löhr & Ross⁽¹²⁾ (1969) 之毛細管內凝集反應 (CA)、Curnow 等⁽¹⁰⁾ (1967) 之間接血球凝集試驗 (IHA)、Curnow⁽⁸⁾ (1968) 之血球凝集試驗 (HA)、Curnow⁽⁹⁾ (1973) 之玻片凝集試驗 (Slide agglutination)、Todorovic & Kuttler⁽¹⁹⁾ (1974) 之卡片凝集試驗 (Card agglutination) 等多種之血清學反應被研究。其中以CF、CA及IFA較俱可靠且廣泛使用。吾國迄今未曾有關這方面之研究，又政府對養牛事業之發展不遺餘力，不斷由國外引進優良品種，但對於疫區之耐過不顯性保蟲牛隻輸入之檢疫，必藉血清學診斷法予以檢疫。再者本省牛隻常因場所異動，造成部份牛隻感染本病死亡之困擾，故本病在檢疫上更不能疏忽，血清學診斷用抗原之研製以供實際需要不容遲疑，有鑑於此筆者等進行了本項試驗，以配合當前實際之需要，作為本病防疫之依據。

材料及方法

一、感染牛血液之採取及供試牛隻：

採取曾感染本病經藥劑治療之放牧牛隻血

液，每頭 10 ml，共得 10 頭，經混合脫纖後置於 4~10 °C 冷藏輸送箱內携返本所，置於 4 °C 冰箱保存備用。供試牛隻一頭為六個月齡荷蘭種小公牛，經血液檢查無焦蟲存在，且該牧場也未曾有本病及壁虱之感染者。此外一頭係牛結核菌素陽性反應淘汰荷蘭種泌乳母牛。

二、實驗牛隻人工感染及病原蟲之分離：

將採得之感染本病耐過牛隻之脫纖血液，以 20 ml 接種於上述小公牛之頸部皮下，另靜脈注射 5 ml，隨後每天觀察其臨床症狀及量體溫，採血鏡檢蟲體及紅血球之計數。經血液檢查俟蟲體出現時採取血液 500 ml，並加入抗凝血劑置於 -70 °C 保存，供為血清學診斷用抗原研製時再行牛隻之接種，以獲得大量的含有蟲體之血液供為抗原製作。

三、血清學診斷用抗原之製作：

將上述分離所得之病原蟲再次感染一頭牛結核菌素陽性反應之泌乳母牛，俟原蟲出現後試殺大量放血，獲得之血液加入抗凝血劑，置於 4 °C 保存備用。血清學診斷用抗原依 Mahoney⁽¹⁵⁾ (1967) 及 Minami 等⁽¹⁷⁾ (1979) 之方法，將含有孢子原蟲之血液經遠心洗滌，溶血後再以蒸餾水抽出孢子原蟲中之可溶性抗原，再經超音波處理製成 C F 抗原（如 C F 抗原調製流程圖）。另依 Löhr & Ross⁽¹²⁾ (1969) 及 Minami⁽¹⁶⁾ (1977) 之方法，將孢子原蟲之血液經遠心洗滌、溶血，所得蟲體再以超音波處理，再遠心取得上清液製成 C A 抗原。（如 C A 抗原調製流程圖）

四、抗原力價測定與反應術式：

(1) 補體結合試驗：依微量法，將血清經 56 °C 30 分鐘非動化後，以 VBS 稀釋成 5~160 倍稀釋列，次將受測抗原稀釋為 2~64 倍稀釋列，將各稀釋階血清以縱行分別以 0.025 ml 注入 U 型反應盤之 6 個孔穴內，抗原亦以 0.025 ml 注入橫行 6 個孔穴內，再將含有 2% 正常牛血清 VBS 稀釋成 3 單位之補體液 0.05 ml 注入各孔穴內，經充分混合後置 4 °C 16~20 小時，翌日加入 0.05 ml 之 2% 綿羊血球之溶血系，置於 37 °C 30 分鐘之感作後，靜置於 4 °C 使血球沉澱後判讀結果。

(2) 毛細管內凝集試驗：將陽性血清以 VBS 稀釋後，依 2 倍稀釋法稀釋成 2~256 倍稀釋列

，抗原稀釋成 0~32 倍之稀釋列，次將 90 mm × 0.5 mm 之毛細管，先吸取 10 mm 高度之抗原，並拭乾管外抗原液，再吸取陽性血清 60 mm，拭去管外血清液後，倒立於泥板上，於室溫 22~25 °C 之反應，1~2 小時第一次判讀，翌日再一次之判讀其凝集反應。

試驗結果

一、病原蟲之分離：

牛隻經野外感染牛之血液接種後，於第 11 天體溫開始上昇，並可檢出呈雙梨子形之原蟲（如照片 1），其型屬 *Babesia*，經 15 天體溫回復常溫，蟲體也即消失，於第 13 天時蟲體數最多，血球相之變化也隨體溫、蟲體之出現而顯著之變化，其臨床所顯示變化僅於發熱期間稍有輕微食慾減退及有眼膩而已（如圖 1 所示）。將分離株再行人工感染牛隻，則於第 3 天體溫即上升，且紅血球也於第 3 天開始減少，並可檢出原蟲，於第 6 天蟲體數約達 8%（如圖 2 及照片 2 所示），此刻即試殺放血收集血液，以 Alsever 保存放置於 4 °C 供抗原製作用。

二、補體結合抗原力價：

Babesia 感染血球經 7 次蒸餾水抽取之抗原，分別與陽性血清行 box titration 之結果，顯示第 3~5 次抽取之抗原力價較佳，但第 5 次抽出之抗原稍有凝集作用，第一次力價最差，且含有抗補體，第 7 次力價雖弱但亦不含有抗補體（如圖 3 及照片 3 所示）。

三、毛細管抗原力價：

試製成之 C A 抗原與陽性血清反應結果，其力價不高，抗原僅於原液及 2 倍稀釋階可見中度或輕度之凝集，且其測得之血清抗體力價也較 C F 測得的低 4 個階，顯示其抗原力價不高，且感度不及 C F 法（如表 1 及照片 5 所示）

四、野外例抗體之測定：
由桃園縣轄患有本病之牧場採得之檢體，經由試製之 C A 及 C F 抗原測得結果，由 10 頭俱有臨床症狀之牛隻測得之 C F 皆呈陽性反應，正常牛隻 5 頭（即無臨床症狀牛隻）僅 2 頭呈陽性反應；C A 則測得 6 頭呈陽性反應，正常牛隻僅 1 頭呈陽性反應，結果如照片 4 及表 2 所示，顯示其試製成之 C F 抗原特异性甚

圖 1 野外毒血人工感染牛隻體溫，紅血球及原蟲之出現

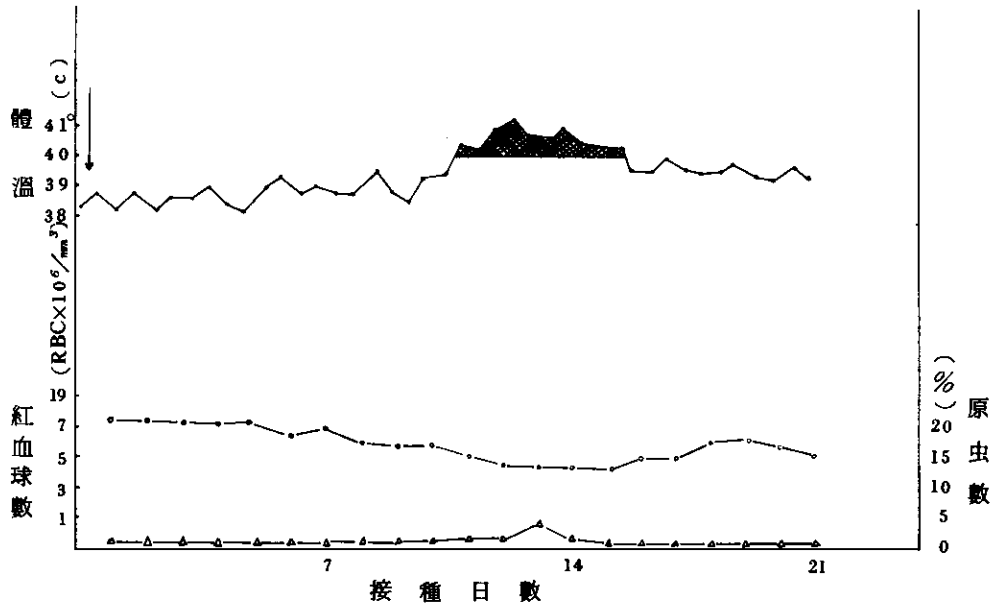
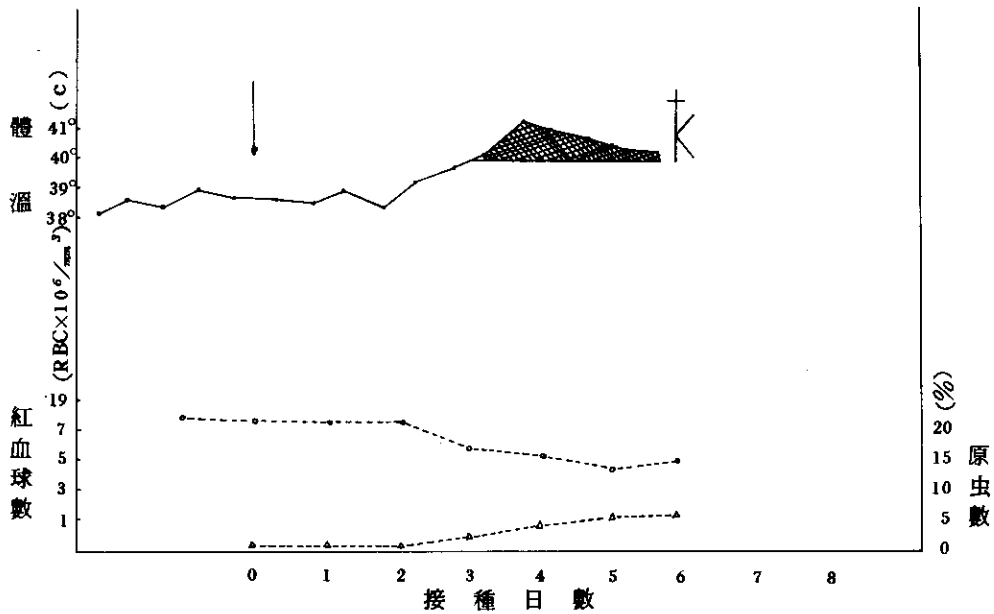


圖 2 分離株人工感染牛隻體溫、紅血球數及原蟲之出現



Babesia CF 抗原調製流程圖

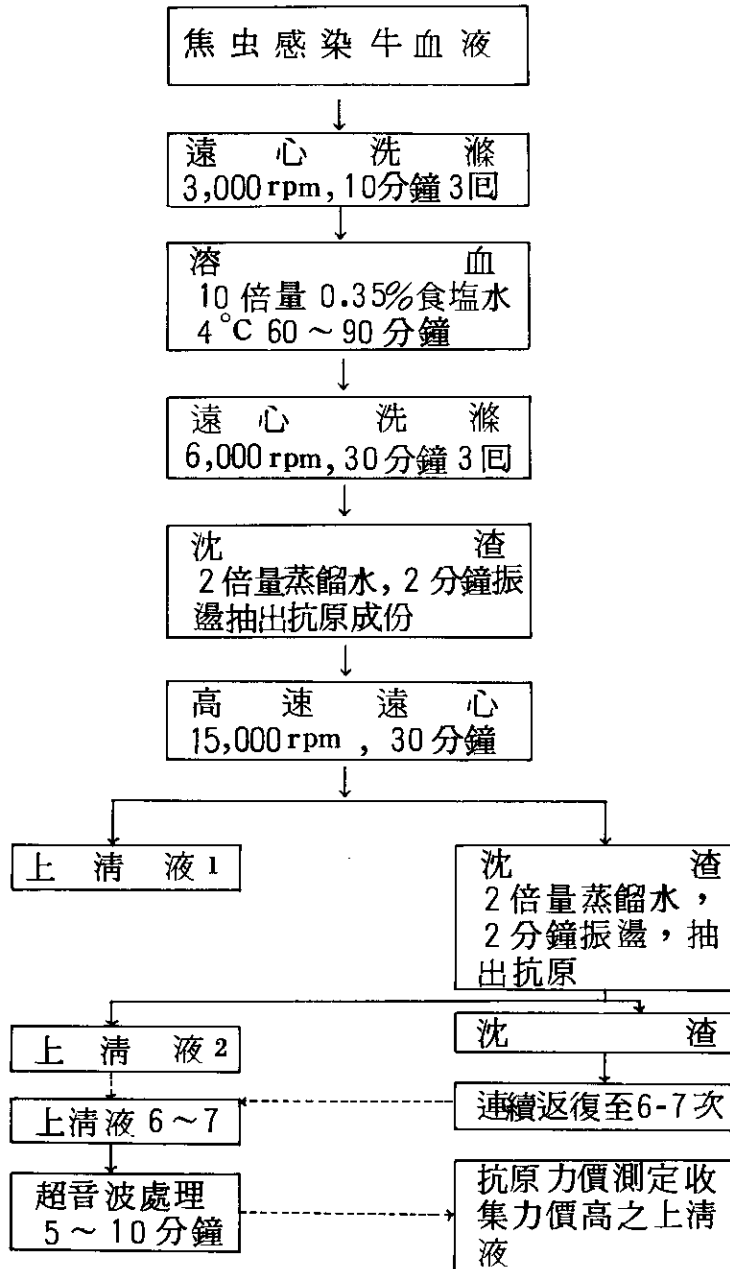


圖 3 Babesia CF 抗原抽出次序之抗原力價

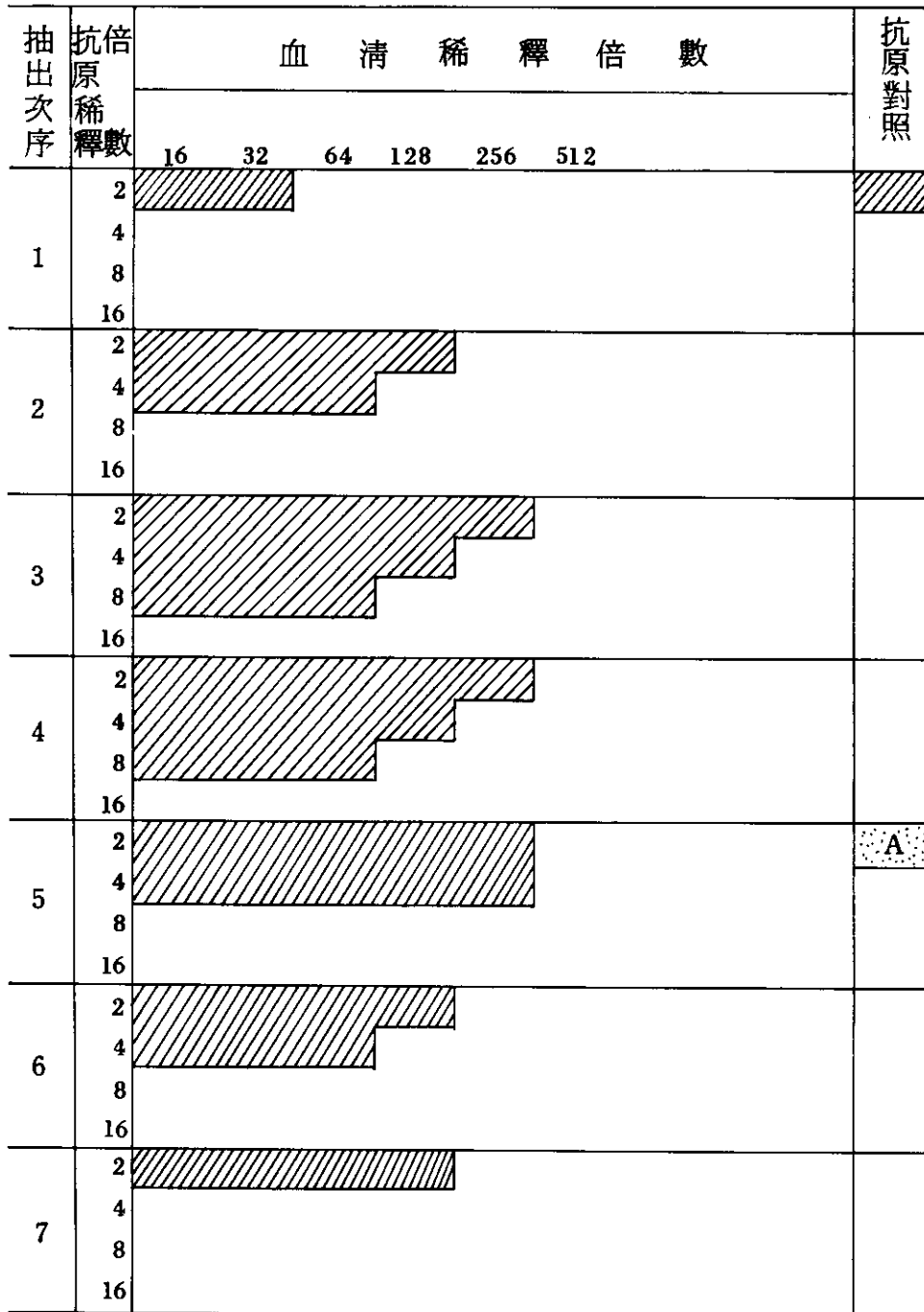
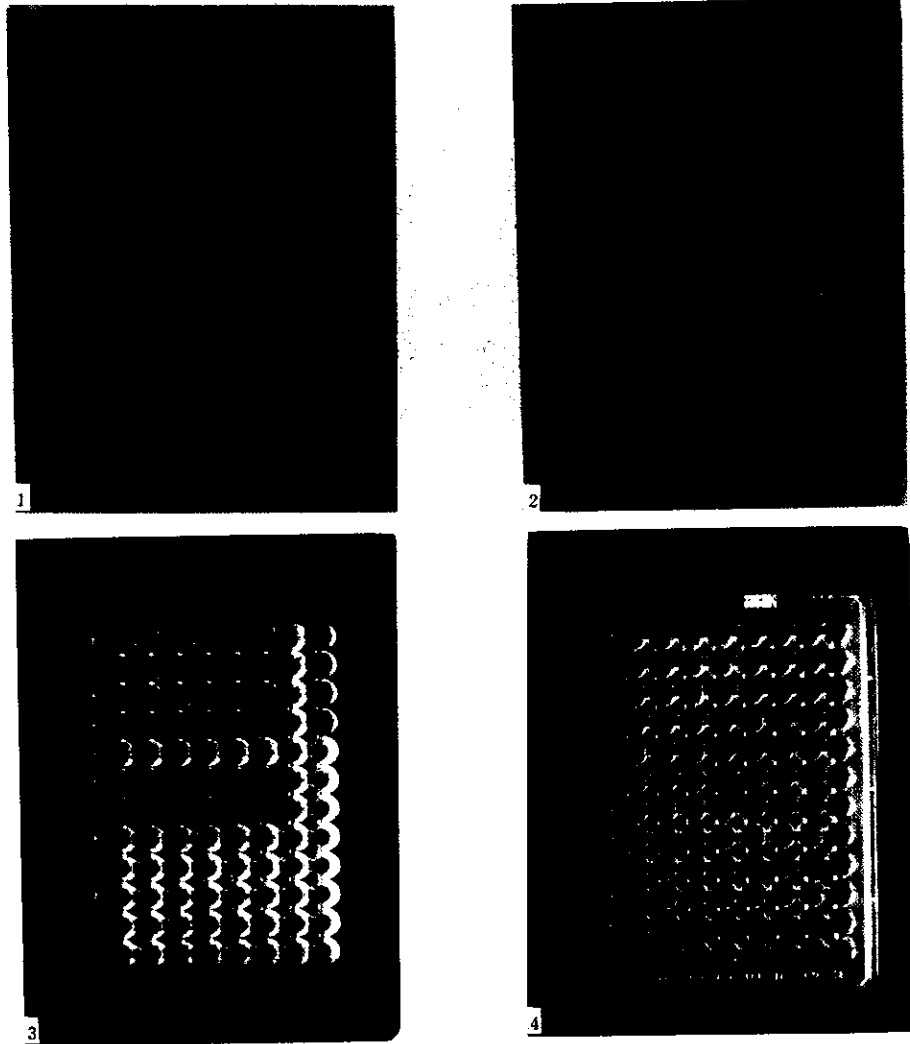
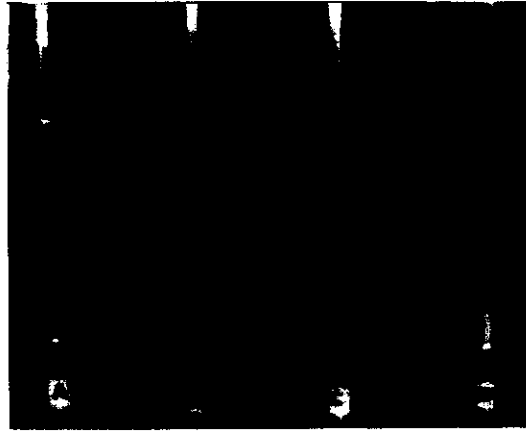


表2 試製CF及CA抗原對野外自然
感染牛隻之測驗

牛隻 號碼	補 體 結 合								毛細管凝集
	C	2	4	8	16	32	64	128	
506	0	4	4	4	0	0	0	0	+
有 45	0	4	4	4	4	4	0	0	++
症 405	0	4	4	4	2	0	0	0	±
狀 413	0	4	4	0	0	0	0	0	-
之 57	0	4	2	0	0	0	0	0	+
感 441	0	4	4	1	0	0	0	0	-
染 77	0	4	4	4	2	0	0	0	+
牛 443	0	4	4	4	4	3	3	0	+
359	0	4	4	2	0	0	0	0	±
226	0	4	4	4	4	4	4	0	++
無 407	0	0	0	0	0	0	0	0	-
症 276	0	0	0	0	0	0	0	0	-
狀 266	0	4	2	0	0	0	0	0	-
牛 (33	0	0	0	0	0	0	0	0	-
健 49	0	0	0	0	0	0	0	0	-
康) 311	0	4	4	2	0	0	0	0	+



- 照片 1：由野外病材分離到之 Babesia 原蟲。
- 2：分離株經人工感染第 6 天血中之原蟲。
- 3：原蟲毒血經蒸餾水第 3 次抽取，C F 抗原之 box titration: A 行為 2~16 倍稀釋之抗原對照（無含陽性血清），6 列為陽性血 16~512 倍稀釋之血清對照（無含抗原），7 列為陰性血清（含抗原）之對照，1 列 2 倍抗原，其陽性血清之力價為 256 倍，2 列 4 倍抗原血清力價為 128 倍，3 列 8 倍抗原血清力價為 64 倍，4 列 16 倍抗原，血球皆溶血呈陰性反應。
- 4：試製 C F 抗原對野外病例反應之實例：H 行為 2 倍稀釋受檢血清之對照（無含抗原），1~10 列為野外有臨床症狀之感染牛（# 506~226）；11~12 列為無臨床症狀同一牧場之牛隻血清，11 列為陰性反應，12 列為 311 號牛之陽性反應。



5 : 試製焦蟲 C A 抗原對野外例血清反應實例，

A 管爲++~+++， B 管爲+，
C 管爲±， D 管爲-。

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 張政宏。1969：牛 *Theileria* 屬焦之分離試驗。台灣省畜牧獸醫學會會報。14：29~37
- 3 張政宏。1970：牛 *Theileria* 屬焦蟲之病原性研究。台灣省畜牧獸醫學會會報。17：42~48
- 4 小泉丹。1910：台灣に於ける牛のバベシヤ病の研究。日本細菌學雜誌。188：427
- 5 平芦勝七。1945：馬ピロプラズマ病の補體結合反應に關する研究。日本獸醫學雜誌。7：197~205
- 6 兒山健二。1941：移入改良和牛に發生シタル(ダ=熱)。台灣畜產會會報。4：157~166
- 7 鳩野政雄、伊東鶴馬、後藤茂。1910：牛のバベシヤ病に就け。日本細菌學雜誌。188：393
- 8 Curnow, J.A. 1968：In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected *Babesia argentina*. *Nature*, 217：267-268.
- 9 Curnow, J.A. 1973：The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasites. *Aust. Vet. J.* 49：290-293.
- 10 Curnow, J.A. & Curnow, B.A. 1967：An indirect haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. *Aust. Vet. J.* 43：286-290.
- 11 Fölsch, D.W. 1970：Survey on Anaplasma-like bodies in small and large ruminants in three areas of Taiwan. *Taiwan Jour. Vet. Med & Anim. Hush.* 17：49-56.
- 12 Löhr, K.F. & Ross, J.P.J. 1969：A capillary tube-agglutination test for the detection of *Babesia bigemina*

- antibodies. *Z. Tropenmed. parastitol.*, 20 : 287-292.
13. Mahoney, D.F. 1962 : Bovine babesiosis : Diagnosis of infection by a complement-fixation test. *Aust. Vet. J.* 38 : 48-52.
14. Mahoney, D.F. 1964 : Bovine babesiosis : An assessment of the significance of complement-fixation antibody based upon experimental infection. *Aust. Vet. J.* 40 : 369-375.
15. Mahoney, D.F. 1967 : Bovine babesiosis : preparation and assessment of complement fixing antigens. *Exp. Parasitol.*, 20 : 232-241.
16. Minami, T. 1977 : Diagnosis of bovine babesiosis by the capillary-tube agglutination test. *J.A.R.Q.* 11, 4 : 234-238.
17. Minami, T., Yamabe, K., Hayashi, S. & Ishimare, T 1979 : Serological relationship of a Japanese *Babesia* species and *Babesia bigemina* by the complement-fixation and capillary-tube agglutination test *Vet. Parasitology* 5 : 29-38.
18. Ross, J.P.J. & Löhr, K.F. 1968 : Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9 : 557-562.
19. Todorovic, R.A. & Kuttler, K.L. 1974 : A babesiosis card agglutination test *Amer. J. Vet. Res.* 35 : 1347-1350.
20. Todorovic, R.A. & Long, R.F. 1976 : Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement-fixation (CF) test for diagnosis of *Babesia* spp. infection in colombian cattle. *Tropenmed. Parastitol.* 27 : 169-181.

STUDIES ON SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE BABESIOSIS IN TAIWAN

SU JEI-FU*, CHENG JIAN-SHENG*,
and
LIAW SHUH-JYI*, LIN PAN-CHIN**

* *Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.*

** *Connical for Agricultural Planning and Development.*

SUMMARY

Babesia spp had been isolated from a cattle herd in Pintung area, then inoculated into young calf and the infected blood was obtained for antigen preparation. The antigen for complement-fixation (CF) test was prepared by distilled water extraction while antigen for capillary-tube agglutination (CA) test was prepared by sonication. CF antigen from the third to the fifth extraction had better antigenicity and did not have any anticomplementary activity. It's titer reached as high as 1:8 while CA antigen showed only 1:2 against positive serum. By the comparison with positive sera of field cases, the accuracy of CF test was 100% (10/10) while that of CA test was 60% (6/10). It was proved that CF test is more sensitive than CA test by this study.