

猪弓蟲病 B. D. B. (Bis-Diazo-Benzidine)

固定乾燥血球抗原之研製及應用試驗

廖述吉 楊敏雄

(臺灣省家畜衛生試驗所)

一、緒 言

近年來本省各地陸續有猪弓蟲病的發生，其傳染性甚烈，且斃死率非常高，同時與其他類症（如猪瘟）鑑別仍感困難，為使能够確實早期診斷，必須簡化操作，以爭取防治時效。本所自民國五十七年七月初以來，即對本病展開調查及 B. D. B. 固定乾燥血球抗原之製造試驗¹⁾。由 H. A 試驗調查資料得知，本省猪隻對本病有甚高之罹病率，筆者等鑑於該病為患的嚴重，為了預防蔓延，因而積極進行有關之研究並大量製造該項抗原作較大樣品試驗以確定其效果，本抗原製造係參照花木氏等（日本動物藥品檢查所）¹⁾及 Park 氏的方法，茲將該項抗原製造之有關試驗成績報告於後。

二、試驗材料

1. 供試弓蟲（原蟲）株：

係 RH 株，由日本農林省動物醫藥品檢查所分讓，供 Antigen 製造及免疫用，其 1,000 個/ml. 以上對猪經鼻感染，約於第四天發病，腹腔接種 20,000 個/ml. 以上，約於第四天即發病，RH 株對於小白鼠，接種於皮下 (56,000 個/0.1ml) 5~6 日即斃死，腹腔接種 (56,000/0.1ml) 4~5 日即斃死。

2. 小白鼠：

為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，田間試驗用猪隻為臺南縣各鄉鎮抽檢猪隻。

三、試驗方法

1. 各種抗原及感作血球等製作之程序¹⁾。

(1) 水劑抗原 (T. S. C. 抗原) 試製

製造方法：RH 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 → 置於 4°C 之冰箱一夜 → 遠心並除去沈渣物 → 上清液即 T. S. C. 抗原 → Titeration 測定。

(2) 固定血球之製作

綿羊血液（採血後於 Alserver 保存液中保存 4~14 日 → 遠心（以生理食鹽水洗滌 5 回） → 以 P. B. S. (P.H7.2) 作成 10% → 加入緩衝酒精福爾馬林 (1:2) 自然沈降 → 酒精福爾馬林交換 (20°~25°C) 4~5 回（一日一回） → 以 P. B. S. (P.H7.2) 作成 10% → 再加入緩衝亞硫酸鈉 (2~3 倍量) 置於水室中 → 上液交換 3 回（一日一回） → 以 P. B. S. 作成 10% → 以冷流水（井水）透析 4 日 → 遠心，以冷 P. B. S. (P. H7.2) 洗滌 3 回 → 用 P. B. S. 作成 50% → 保存於 4°C 水室。

(3) B. D. B. (Bis-Diazo-Benzidine) 之製作

(臺灣畜衛試研報 6, 75~80, 1969)

Benzidine 0.46g → 溶於 100ml 之 0.25N 鹽酸之中 (0.5°C) 冷却之 → 攪拌 → 再加入 3.5% 之冷却亞硝酸鈉液 10ml 攪拌 5 分鐘 → 以後間隔 5 分鐘攪拌一分鐘 → 分裝於小容器內 (2~5ml) → 用乾水急速凍結 → 保存於零下 50°C 或零下 20°C。

(4) 弓蟲感作血球之製作

稀釋抗原液 (用 P. B. S. P.H7.2) 30ml + 50% 固定血球液 1.0ml + 20 倍 B. D. B. 液 (以冷 P. B. S. 稀釋) 15ml 按順序混合 → 於 37°C 感作 15 分鐘 → 冷 P. B. S. (P.H7.3) 洗滌 2 回 → 急速凍結真空乾燥 → Titeration 測定。

(5) 抗原感作血球液 (S. E. S.) 之製作

B. D. B. 固定乾燥血球抗原 → 加入附屬的懸濁用液 4ml 完全溶解後移到遠心管 → 靜置約一小時 → 再度攪拌 → 遠心 2,000rpm 5' → 去除上清液 → 沈渣加入 46ml 之懸濁液使之均勻浮遊 → 加入 1/10,000 之 Merzonin 使保存性佳良。

2. 試製 B. D. B. 抗原與他種抗原作 H. A 反應比較試驗。

(1) 供試豬隻係本所弓蟲病人工免疫豬 4 隻及 1 隻 S. P. F. 豬作試驗對照，以及田間試驗豬隻數百隻。分皮內反應組，臺製 B. D. B. 組，日製 B. D. B. 組，單寧酸處理抗原組，行效力比較試驗。

(2) 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 30 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。

(3) H. A 試驗：依佐藤法施行¹⁾

① B. D. B. 固定乾燥抗原：

將血紙剪碎加 0.6c.c. S. E. S. (等於血清稀釋倍數 16 倍) 以後依次稀釋為 X64, X256, X1024, X4096 於 37°C 感作 3 小時後移室溫靜置一夜判定。

② 單寧酸處理血球抗原：

將被檢血清用 2% N. S. S. 加 P. B. S. (P.H7.2) 依次稀釋 X4, X16, X64, X256, X1024, X4096 倍後再加 3% 單寧酸處理血球抗原液每孔 0.05ml 振盪使之混勻後置 37°C 感作 3 小時後移室溫靜置一夜判定。

四、試驗成績

B. D. B. 固定乾燥血球抗原與單寧酸處理血球抗原之 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與陰性豬隻作分組試驗，分皮內反應組，單寧酸處理抗原組與日製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原組及臺製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原組行效力比較試驗。結果如下表 I

表 I 人工免疫與 S. P. F. 豬血清 H. A. 試驗成績

豬 號 碼	TSC 皮內反應	單寧酸處理抗原	B. D. B. 抗原 (臺製)		B. D. B. 抗原 (日製)	備 註
			Lot I	Lot II		
# 3	-	64	64	64	64	
# 4	+	64	64	64	64	
# 5	+	64	64	64	64	
# 6	+	256	256	256	256	
對照 #1 S.P.F.	-	4	<64	<64	<64	

(1) 供試豬隻係中豬隻 (30~35 台斤)，對照豬係採用 S. P. F. #1 小豬。

(2) 皮內反應用 T. S. C. 抗原為本所製售品 Toxoplasmin 每隻注射於耳背側之皮內 0.2ml。

(3) 單寧酸處理組，臺製 B. D. B. 固定組，均用 2 H. A 單位價。

) T. S. C. 試驗陽性率估75%，單寧酸處理血球抗原與臺製及日製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原行 H. A 試驗均佔100%之陽性率。

2. 對於種母猪血清之測定試驗：

由臺中農業改良場送檢之種母猪血清共17頭，分組以單寧酸處理血球抗原與 B. D. B. 固定乾燥血球抗原行 H. A 反應比較試驗，結果如下表 II

表 II 種母猪血清試驗成績

組 別	供 試 頭 數	供 試 材 料	判 定		H A 試 驗 成 績					備 註
			-	+	≤16	×	256	1024	4096	
單寧酸處理抗原	17	臺中農改場種母猪血清	17	0	17 (100%)	0	0	0	0	
B.D.B.固定抗原	17	豬臺中農改場種母猪血清	17	0	17 (100%)	0	0	0	0	
對 照 組	1	S. P. F. 豬血清	1	0	1 (100%)	0	0	0	0	

(1)供試17隻中，單寧酸處理血球抗原組與 B. D. B. 固定乾燥血球抗原組均為陰性，成績一致性。

(2)對照組均呈陰性反應，本試驗有正確性。

3. 對於成猪血清之測定試驗：

以臺南縣家畜疾病防治所在各鄉鎮隨機抽取成猪血清 302 例，分組以單寧酸處理血球抗原及 B. D. B. 固定乾燥血球抗原行 H. A 反應比較試驗，結果如下表 III

表 III 成猪血清 H.A. 試驗成績

組 別	供 試 頭 數	供 試 材 料	判 定		H A 試 驗 成 績				
			-	+	≤16	64	256	1024	4096
單寧酸處理抗原	302	臺南縣送檢猪血清	275 91.06%	27 8.94%	275 91.06%	24 7.95%	1 0.33%	2 0.66%	0
B.D.B.固定抗原	302	同 上	280 92.72%	22 7.28%	280 92.72%	22 7.28%	0 0%	0 0%	0
對照組 S.P.F. 猪	1	S.P.F. 猪血清	1	0	0	0	0	0	0

(1)供試302頭中，單寧酸處理抗原測定呈陰性反應有 275 頭佔91.06%，呈陽性反應者有27頭，佔 8.94%。

(2)同時以302頭中，以 B. D. B. 固定乾燥血球抗原測定呈陰性反應有280頭，佔 92.72%，呈陽性反應者有22頭，佔 7.28%。

顯著性測定：

H. A 試 驗	單寧酸處理血球抗原	B.D.B.固定乾燥血球抗原	和
陽 性	27	22	49
陰 性	275	280	555
和	302	302	604

統計結果 $|T|=0.75 < T_{0.05}=1.96$ 不顯著

4. 保存性試驗：

將試製二批 B. D. B. 固定乾燥血球抗原置於冷室 (4°C) 保存。保存期間分一個月，三個月，六個月及一年四組分別取出以本所弓蟲病人工免疫豬血清 4 隻及 S. P. F. 豬血清一隻作 H. A 反應結果如下表 IV

表 IV 試製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原保存性試驗成績 (H. A, 試驗)

試批製號	豬號碼	試製直后	保存一個月	保存三個月	保存六個月	保存一年
Lot I	# 3 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 4 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 5 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 6 (陽性豬)	×256	×256	×256	×256	×64
	# 1 (S.P.F.豬)	—	—	—	—	—
Lot II	# 3 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 4 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 5 (陽性豬)	×64	×64	×64	×64	×64
	# 6 (陽性豬)	×256	×256	×256	×256	×64
	# 1 (S.P.F.豬)	—	—	—	—	—

(1)製造直後，保存一個月，保存三個月，保存六個月，及保存一年等五組，以弓蟲人工免疫豬血清 4 隻作 H. A 試驗，各組都顯示出 100% 之陽性率且兩批力價均相同。

(2)S. P. F. 豬血清一隻，兩批各組均顯示陰性。

(3)Lot I 之製造日期是五十八年二月初 10 日，Lot II 之製造日期是五十八年三月初 5 日。

五、討 論

本次 B. D. B. 固定乾燥血球抗原之研製試驗¹⁾共試製二批，每批抗原均與單寧酸處理血球抗原及日製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原作 H. A 比較試驗，試驗材料則以人工接種 *Toxoplasma* 免疫豬血清²⁾及 S. P. F. 豬血清供試，成績均如理想。單寧酸處理血球抗原必須以普通方法所分離的血清作試驗材料³⁾，而 B. D. B. 固定乾燥血球抗原則為從吸血紙浸透出的血清作試驗材料³⁾，故兩者血清量在操作時必須標準化（採血紙吸血部必須完全浸透血液）方能使血清稀釋倍數一致。在操作上 B. D. B. 固定乾燥血球抗原作 H. A 試驗時只須將成品適當稀釋即可應用，無需特殊技巧與設備，且用吸血紙採血即可進行，採血亦非常省時，準確性又與單寧酸處理抗原一致，故極易推廣應用，工作者不需自製與處理抗原，僅几道簡單操作手續即可完成，此外安定性亦非常良好。單寧酸處理血球抗原操作手續繁雜費時，且必須有適當設備才能進行，供試所需血清量較多，採血工作亦比較費時，又不能長久保存應用上缺點很多。而 T. S. C 皮內反應手續雖亦簡單，但準確性低。

六、結 論

1. 以人工免疫豬及 S. P. F. 豬血清實施 B. D. B. 固定乾燥血球抗原，單寧酸處理血球抗原及 T. S. C. 皮內反應分組試驗檢討結果，除 T. S. C. 皮內反應陽性率為 75% 外，其他臺製，日製 B. D. B. 固定乾燥血球抗原組及單寧酸處理血球抗原組均佔 100% 的陽性率其成績一致。

2. 就種母豬 HA 試驗成績言，B. D. B. 固定乾燥血球抗原與單寧酸處理血球抗原組其成績仍然一致，均為陰性。

3. 再觀察田間試驗成績，B. D. B. 固定乾燥血球抗原行 H. A 試驗（供試 302 頭中），呈陰

性反應有280頭，佔 92.72%，呈陽性反應者有22頭，佔 7.28%，同時以 302 頭中，以單寧酸處理抗原測定其 H. A 反應，呈陰性反應有275頭，佔 91.06%，呈陽性反應者有22頭，佔 8.94%。經統計分析結果實測 $|T| < T_{0.05} = 1.96$ ，差異不顯著，亦即 B. D. B. 固定血球抗原能代替單寧酸處理血球抗原作 H. A 試驗之用。

4. 依據保存性試驗成績顯示，本抗原雖保存至一年仍能供作 H. A 試驗之用。

5. 綜合上述試驗結果，B. D. B. 固定乾燥血球抗原較單寧酸處理血球抗原作 H. A 試驗時具有操作簡便，安定性良好之優點。

本試驗研究承蒙臺中農業改良場畜牧課同仁及臺南縣家畜疾病防治所同仁惠予協助提供材料，以及本所陳所長守士及林課長再春博士之校閱與指導並寬籌經費等，使本試驗得以順利完成，無任感激，在此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. 花木琢磨，信藤謙藏，佐藤卯三郎：Toxoplasma 血球凝集反應に関する研究，第57回日本獸醫學會（第6部會）47,16~17(1964)
2. 信藤謙藏：猪のToxoplasma症の診斷，獸醫畜產新報及 283,785~790及284,849~853 (1961)
3. 信藤謙藏：Toxoplasma 症と其の診斷，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，廣應醫學第37卷第9號1631~1638(1960)

Studies on the production and utilization of B.D.B. fixed & freeze-dried erythrocytes sensitized with Toxoplasma antigen

By S. C. Liao & M. S. Yang

(Taiwan Provincial Research Institute For Animal Health)

In recent years, Toxoplasmosis has extensively occurred in Taiwan. This disease was difficult to distinguish from other diseases such as hog cholera. For pursuing a simple and accurate method to diagnose Toxoplasmosis, the authors have produced B.D.B. fixed & freeze-dried erythrocytes sensitized with Toxoplasma antigen according to the procedures described by National Veterinary Assay Laboratory in Japan and Dr. Park. From furthermore research, the experimental results were summarized as follows:

1. The sera collected from immuned pigs and S. P. P. pigs were performed H.A. test with B. D. B. fixed & freeze-dried RBC antigen and tannic acid fixed antigen. The T.S.C. antigen was carried out intracutaneous reaction. The positive percentage of T. S. C. test was 75%, while the positive percentage of HA test with the different antigen was 100%.

2. The sera obtained from sows and performed H.A. test with two antigens got the same negative results.

3. The sera taken from 302 heads of field pigs were performed H. A. tests with the two different antigens. In the B. D. B. antigen group, there were 280 cases showing negative reaction, the percentage was 92.72%, 22 cases with positive reaction (7.28%). In the Tannic acid group, 275 cases showed negative reaction (91.06%), 22 cases with positive reaction (8.94%). From above results and statistical standpoints, H.A. test performed with both antigens got the same result.

4. B. D. B. fixed & freeze-dried RBC antigen Preserved for more than one year still maintained its antigenicity.

5. Not only the stability of B. D. B. fixed & freeze-dried RBC antigen was higher than that of tannic acid fixed antigen, but also the procedure in HA tests was simpler than that of Tannic acid fixed antigen.