

鷄慢性呼吸器病 (C. R. D) 診斷液之製造試驗

謝竹茂 陳由昌

(臺灣省家畜衛生試驗所)

一、緒 言

鷄慢性呼吸器病 C. R. D 診斷液在各先進國家都已相繼問世，但在吾國尚無自製成品，而本省鷄隻對 C. R. D 污染情形調查報告（五十五年度本所研究報告）其污染率高達 17.9%，故亟待研製該診斷液供為防治之用，以期確保鷄隻健康，進而增加生產。筆者於民國 54 年奉赴日本研修回國後依照 Adler 氏開始從事本項診斷液之研製，茲謹將迄至目前所得結果報告於下，敬請諸先進惠賜指正，是幸。

二、材料、儀器及試藥

1. 供試菌株：係由日本農林省家畜衛生試驗場分讓之 *Mycoplasma Gallisepticum* S₆ strain。
2. 培養基：日本榮養化學株式會社出品之 PPLO 增菌培地及 Difco PPLO Agar 加非動化健康馬血清 15~20% 及 crystalline Penicillin G 1000 μ /ml。
3. 遠心分離器：使用美製 50,000 r. p. m 之 Sharplas 高速低溫遠心器及 4,000 r. p. m. 普通遠心分離器。
4. 菌體濃度調整器：採用 Spectronic 20 colorimeter。
5. 陽性血清：由日本農林省家畜衛生試驗場分讓之 *Mycoplasma Gallisepticum* 抗原用標準血清及以 *Mycoplasma Gallisepticum* S₆ 標準株由本所自製之陽性血清。
6. 菌體濃度稀釋液：採用 Cox buffered 及 Sorensen's buffered Solution
7. 着色劑：1% 之 Crystal violet。
8. 診斷液防腐劑：1% 之 Mazaline。

三、試驗方法及成績

1. 陽性血清之製造：以 PPLO broth 培養之活菌液每隔一天以 0.5ml 注射於健康中鷄靜脈內於第五次注射後之第 10~12 天採取血清加一萬分之一 Merthiolate 於下 -20°C 保存供診斷液之力價測定用。
2. C. R. D 診斷液之製造：以 5,000 ml 之燒瓶盛 3,000 ml 之 PPLO broth 加十分之一量之種菌液於 37°C 培養 48~72 小時後以高速遠心分離器集菌（第一、二、三批係以 ShrPlas 30,000 r. p. m 收集，第四、五、六批係以普通遠心分離器 4,000 r. p. m 30 分鐘收集）將收集所得之菌體以 cox buffered saline 或 sorensen's buffered solution 洗取再以 spectronic 20 colorimeter 調整菌液之濃度在波長 620 m μ 之 7% 後再加百分之一的 1% crystal violet 及 1% Mazaline 作為防腐劑，即成為 C. R. D 急速平板凝集用之診斷液，供為下列諸試驗用。
3. 保存性試驗：將試製成之六批 C. R. D 診斷液分別保存於冷室 (3~5°C) 及室溫 (17~32°C) 每經一個月後任意抽取與 *Mycoplasma Gallisepticum* 標準陽性血清及陰性血清做急速凝集反應檢查，即血清一滴加診斷液二滴充分混合後二分鐘判定結果，其成績如表 1。

表一 CRD 診斷液保存性試驗成績

診斷液 批號	製造 直后	冷室 (3-5°C)						室溫 (17-32°C)					
		1個月	2個月	3個月	4個月	5個月	6個月	1個月	2個月	3個月	4個月	5個月	6個月
Lot1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Lot2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Lot3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Lot4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Lot5	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Lot6	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
對照陰 性血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

由表1.之成績觀之，其冷室之保存性較室溫者為佳，在製造後保存六個月尚具有凝集力價，且室溫保存者在一個月後診斷液着色劑之顏色即已退色呈淡紫色。

4. 試製成之 C. R. D 診斷液與美、日、德製診斷液之力價比較試驗：就試製之六批診斷液與美、日、德製者分別與抗原用標準血清行急速平板凝集反應，以究明試製之診斷液與美、日德製者力價之差異所得成績如表2。

表二 試製成之診斷液與美、日、德製診斷液對標準血清之力價比較成績

標準血清 No. ※	診 斷 液								
	日 本	美 國	德 國	本 所 Lot 1	本 所 Lot 2	本 所 Lot 3	本 所 Lot 4	本 所 Lot 5	本 所 Lot 6
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
928	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

由表2.可知試製成之六批 C R D 診斷液與美、日、德製診斷液力價比較結果均能一致。

5. 試製成診斷液之敏感性試驗：為明瞭所試製成診斷液之敏感性與外國製品之差異以標準陽性血清測定所得成績如下表3。

表三 試製成診斷液之敏感性試驗成績

標準血清 No. ※	診 斷 液								
	日 本	德 國	本 所 No. 1	本 所 No. 2	本 所 No. 3	本 所 No. 4	本 所 No. 5	本 所 No. 6	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	—	—	—	—	—	—	—	—	
4	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	21"	20"	37"	22"	21"	20"	20"	21"	
928	21"	20"	37"	22"	21"	20"	20"	21"	

由上表觀之，所製成之六批診斷液其敏感性不遜於外國製者，Lot 1 之敏感性較差因該 Lot 之

菌體濃度為620m μ 波長之37%之故。

※ 註：標準血清 H. A titer

血清 No.	稀釋 倍數	× 20	× 40	× 80	× 160	× 320	× 640	× 1280
1		—	—	—	—	—	—	—
3		±	—	—	—	—	—	—
4		—	—	—	—	—	—	—
5		卅	卅	卅	卅	卅	+	—
928		卅	卅	卅	卅	+	±	—

6. 野外應用試驗：以試製成之診斷液行野外試驗，其成績如下表。

表四 野 外 應 用 試 驗 成 績

成		雞		中		雞	
檢查隻數	陽性隻數	陰性隻數	陽性率	檢查隻數	陽性隻數	陰性隻數	陽性率
500	96	404	19.2%	600	101	499	10.7%

表內所列成績係由試製成之診斷液檢查陽性後，再以外國製者復檢亦為陽性者，其成績並無出入均屬一致。

7. 由野外應用試驗檢出之陽性雞行病原分離試驗：據本所55年 C. R. D 全省污染情形調查及病原分離研究報告，可由 C. R. D 診斷液檢出之陽性反應者分離得到病原，本試驗係用該報告之分離方法由試製成之 C. R. D 診斷液，檢出之陽性反應雞行病原分離以證明所製成診斷液之正確性，所得結果如下表所示。

表五 試製成之CRD診斷液野外應用檢出之陽性反應雞行病原分離成績

陽性雞號碼	病 原 分 離 部 位				備 註
	眼窩下洞	氣 管	肺	氣 囊	
1	—	—	—	—	
2	—	+	—	+	
3	—	—	—	—	
4	—	—	—	—	
5	—	—	—	—	
6	—	—	—	+	
7	—	—	—	—	
8	+	—	—	+	
9	—	—	—	—	
10	—	—	—	—	

註 +表示Mycoplasma gallisepticum 分離陽性
—表示Mycoplasma gallisepticum 分離陰性

(20)

由上表可知所試製成之 C. R. D 診斷液檢出之陽性鷄經病原分離結果能分離出 *Mycoplasma Gallisepticum*。

四、討 論

1. 診斷液製造用菌之培養，於本試驗中分 37°C 48 小時及 72 小時培養，經試驗結果以 48 小時培養者較為理想，如此可消除自家凝集原因之一，Adler 氏亦採取 48 小時培養。

2. 菌體之收集 Adler 氏採用 Servael continuous-flow centrifuge (17,000 r. P. m 34,800×G) 於本試驗中分別採用本所已有之美製 Sharples 高速低溫遠心器 (30,000 r. P. m) 及普通遠心器 (4,000 r. P. m) 結果 Sharples 之收集量極為理想。

3. 菌體濃度稀釋液於本試驗中採用 cox buffered saline, 及 sorensen's buffered solution 二種，經試驗結果以前者稀釋者易產生自家凝集，後經依照 Adler 氏所採用之 sorensen's buffered solution 結果極為理想。

4. 診斷液菌體之濃度據 Adler 氏報告為 Spectronic 20 colorimeter 650m 之 56% 即可，而於本試驗中採用波長 620m μ 之 7% 所製成之診斷液其成績尚屬理想。

5. 德國出品之 C. R. D 診斷液未加着色劑，目的在於防止自家凝集，於本試驗中為使凝集塊明顯以便判定而加百分之 1 之 1% crystal violet 結果亦無自家凝集現象之發生。

6. 供為力價測定之 *Mycoplasma gallisepticum* 陽性血清由日本農林省家畜衛生試驗場分讓者，而自行製造者應比照其 HA 價後供本診斷液之檢定用。

五、結 論

1. 試製成之六批 C. R. D 診斷液與 *Mycoplasma Gallisepticum* 標準血清行凝集反應檢查，結果陽性血清在 2 分鐘以內呈極明顯凝集反應，陰性血清無反應。

2. 冷室保存及室溫保存性試驗，結果於冷室保存者較室溫保存者良好，而且所保存之力價可維持六個月以上。

3. 試製成之六批 C. R. D 診斷液與美、日、德製診斷液作力價比較試驗結果其敏感性均能一致。

4. 試製成之六批 C. R. D 診斷液在野外應用時檢出之陽性鷄 10 隻經病原分離結果檢出 *Mycoplasma Gallisepticum* 3 例。

本試驗承蒙農復會補助經費，日本農林省家畜衛生試驗場安藤敬太郎博士等之指導，本所前任所長王銘堪，暨現任所長李博士永基及製造課長林博士再春之懇切指導與鼓勵謹此致謝

Study on The Production of Chronic Respiratory Disease Antigen For Chickens

T. M. Shieh and Y. C. Chin

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
Taipei, Taiwan, China

English Summary

Although chronic Respiratory Disease (C. R. D) antigen was already produced commercially in the United States of America and other countries, it has not been manufactured locally in Taiwan.

In 1967, a study on the production of this kind of antigen was performed. The antigen was prepared from the broth culture of *Mycoplasma gallisepticum*

by the method of H. E. Adler. The strain used in the preparation was S6 strain supplied by National Institute of Animal Health, Japan. A field trial was also performed to test the antigen. The results are summarized as follows:

1. The antigen prepared under present study, agglutinated within two minutes by the standard antiserum and by that of the positive reactors.
2. The keeping quality of this antigen was very high. It possessed the same titers after it was stored at a temperature of 2 to 5°C for 6 months.
3. The antigen reacted with the same degree of sensitivity when compared with those manufactured in the United States, Japan, and Germany.
4. *M. gallisepticum* was isolated from the chickens which showed positive reaction to this antigen in the field trial.

NOTE: The outline of this paper was read before the 1967 Annual Meeting of the Taiwan Association of Animal Husbandry and Veterinary Medicine.

References

1. Hall, C.F. : *Mycoplasma gallisepticum* antigen production. Avian Dis. 6. 359-362, 1962.
2. H. E. Adler and A. J. DAMASSA : Antigenicity of six isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. Vol IX No. 2. 1965. (205-211)
3. Adler H. E. : A comparison of some characteristics of *Mycoplasma* Var. *Mycoids* and *Mycoplasma gallisepticum*. Am. J. Vet. Res. 25. 243-245, 1964.
4. Mo, Baharsefat and H. E. Adler. : Hemagglutination and hemagglutination-inhibition with killed *Mycoplasma* antigen. Avian Dis. Vol IX, No. 4 1965 (566-570).