

計畫編號： DOH98-DC-2039

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

馬匹進行各種蛇毒抗原免疫對馬匹血液生理值之影響

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：連偉成

研究人員：鄭雅芬、謝文欽、劉健信、李佳蓉、陳昭宏

執行期間：98 年 4 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(9)
討論與建議	(19)
參考文獻	(22)
第二次進度報告審查意見回覆	(23)

中文摘要

利用馬匹免疫蛇毒，仍是現今生產抗蛇毒血清之主要製造方法。因馬匹採購及飼養所費不貲，有健全的身體健康監控，以避免身體損傷甚至死亡而影響抗蛇毒血清之品質及產量，是為本計劃所進行的目標重點。希望在蛇毒免疫過程中，可了解蛇毒及蛇毒抗原製備方法所造成馬匹各種生理生化值之改變，建立相關血清馬匹臨床數據，作為未來免疫方法及馬匹選擇分組參考依據，藉以提昇抗蛇毒血清之品質。

本研究利用本局於后里馬場所飼養馬匹 32 匹，依照免疫蛇種不同、免疫毒處理有無經 GA 處理、不同 pH 值及採血前後回灌與否進行馬匹分組，並於免疫過程中持續進行馬匹血液生化值的數據收集，並利用 T-test 進行統計分析。

結果發現 (1) 不同免疫蛇毒群組間比較：結果發現不論免疫何種蛇毒其其免疫前後紅白血球均有變化，其中以免疫鎖鏈蛇毒之馬匹群組在統計上與未免疫對照組馬匹比較，結果均呈現有顯著差異($P < 0.01$)；此外免疫前後大部份馬匹之血球蛋白均有升高趨勢；在生化值部份所有免疫馬匹與對照組馬匹在統計上無明顯差異。(2) 比較免疫出血性蛇毒族群進行無毒化之比較：未經 GA 處理之馬匹其 GGT 平均值高於正常參考值，且未經 GA 處理之馬匹其 BUN、ALKP 及 AST 之平均值均大於經 GA 處理之馬匹，而兩組之間有統計上的顯著差異($P < 0.01$)。(3) 不同蛇毒經 GA 無毒化後之血液生化值比較：結果發現經 GA 處理過之馬匹其 GGT 平均值，均明顯低於所有免疫馬匹 GGT 平均值，且兩組分布與所有馬匹分布呈現顯著差異($P < 0.01$)。(4) 比較不同酸鹼值下使用 Formalin 進行出血性粗毒無毒化對馬匹生理生化值影響：結果發現高 pH 值組別之的 HCT 下降幅度最為明顯且其平均值低於全體馬匹平均值($38.23 \pm 5.92\%$)，但統計上並無顯著差異($P > 0.01$)。(5) 馬匹採血前後 HCT 變化及其恢復情形：結果發現，發現所有馬匹在採血前及採血後隔天，在 HCT 均有統計上的顯著差異 ($P < 0.01$)；另外發現採血後兩週無論有無回灌馬匹，其 HCT 值雖然與已經跟採血前無顯著差異，且都恢復至正常參考值範圍間(32~52%)，但是採血後有回灌馬匹其 HCT 上升速度及族群恢復比率比未回灌馬匹速度快。

本實驗結論根據上述結果列出各種蛇毒在免疫過程中，所應特別注意之血液生化值，如出血蛇毒群組：應加強注意紅白血球及肝功能中 GGT 指數；百步蛇毒群組：應加強注意紅白血球；鎖鏈蛇毒群組：應加強注意紅白血球、腎功能(BUN 及 Creatine)及肌肉指數 (AST 及 CK)；此外經 GA 無毒化處理過的蛇毒可能降低馬匹在肝功能方面的傷害。關於馬匹採血後仍建議需進行後續血球回灌，且採血後馬匹建議至少需要兩周至六周的恢復期。

關鍵字：蛇毒、抗蛇毒血清、馬匹血液生化值。

前言

台灣地處亞熱帶，氣候溫暖潮濕，地形上多山、丘陵及溪流，動植物生長茂盛，極適合蛇類生長繁殖。在臨床上有六種毒蛇較為重要，且人被咬傷頻率較高，其毒性亦較大。它們是眼鏡蛇(飯匙倩 *Naja naja atra*)、雨傘節 (*Bungarus multicinctus*)、赤尾青竹絲(赤尾鮎 *Trimeresurus stejnegeri*)、龜殼花 (*Trimeresurus mucrosquamatus*)、百步蛇 (*Deinagkistrodon acutus*) 及鎖鍊蛇(*Doboia russellii formosensis*)。除了鎖鍊蛇分佈較偏重南部及東部山區之外，其它五種毒蛇在全台各地都可見到，只是量的多寡而已，咬傷之後臨床上的症狀，前二類毒蛇屬於神經毒性，造成肌肉麻痺、呼吸衰竭；後四類則屬出血性毒，被其咬傷後局部會腫脹、瘀血、傷口流血、劇痛，全身性的症狀則是血小板降低與各器官出血。另外，被眼鏡蛇咬傷後傷口附近亦會腫脹、瘀血。

國人從事休閒旅遊活動已越來越興盛，人們愈接近大自然便有更多的機會和周遭的動植物接觸，因此被毒蛇咬到的機會也隨之增加。根據西元 2002 至 2005 年健保資料庫統計，台灣每年被蛇咬傷約有 3,823 人，當中有 2,018 人有使用抗蛇毒血清的住院就醫紀錄。台灣地區每年 4-5 月開始被毒蛇咬傷人數開始增加，而於 8 月達到最高峰，之後逐月減少至 12 月及 1 月最少。被咬傷病人中以男性比例最高，男女比例約 7:3 (劉等人, 2009)。目前國內醫學對於毒蛇咬傷，所採取的醫療措施均以注射抗蛇毒血清來中和蛇毒，每年抗蛇毒血清使用量中，出血性抗血清約 1600 瓶，神經性抗血清約 600-700 瓶，且需求有逐年增多趨勢。因此，各種抗蛇毒血清之製備，當中所要求產量及力價之品質要求便顯得十分重要 (Lalloo *et al.*, 2003; Hodgson *et al.*, 2006; Winkel *et al.*, 2006; 劉等人, 2009)。

以馬匹生產抗蛇毒血清，已是本局的例行性業務。但如果沒有減低蛇毒的毒性，以小劑量蛇毒漸增，刺激馬匹的免疫系統，最終還是會造成馬匹中毒傷害的病例。蛇毒採集日趨困難，且採購免疫用馬匹亦所費不貲，生產抗蛇毒血清的馬匹在注射入各種蛇毒後，常會因為不明原因或是健康狀況不佳而導致產生的抗體力價低落之情形，也有因此而死亡。若是能定期給予馬匹健康上的檢查，就能降低其損失。本實驗擬比較現行蛇毒抗原製

備方法，追蹤馬匹免疫過程各種血液生化值之變化，了解蛇毒免疫馬匹的生理狀況和健康情形，隨時進行監控，如果有疾病發生時，可以給予最即時的治療，另一方面可使馬匹在最佳的身體狀況下，生產最佳品質的抗蛇毒血清。

蛇毒注射後的馬匹血液生理值反應為何，目前國際上也沒有任何的參考文獻發表，若是能藉此研究來進行了解，定能提昇製造抗蛇毒血清的品質和技術。也可藉由此研究了解蛇毒注射後的各項血液生化數值、抗體力價、注射時間、注射間隔等等之間的關聯，對於日後在進行製備抗蛇毒血清的過程、技術及研究上，定能提供更大的幫助。在經濟上，不但能降低因健康問題而造成的馬匹損失，更能提昇抗蛇毒血清產量和品質，使同一匹馬能產生更高力價的抗體，使用的壽命也增加，減少了添購新馬的花費。

材料與方法

1. 馬匹來源：

本次實驗共收集本局於后里馬場所飼養馬匹 32 匹，先依照免疫蛇種不同分成三大群組，分別為：出血蛇毒免疫組(24 匹)、百步蛇毒免疫組(6 匹)及鎖鏈蛇毒免疫組(2 匹)。其性別分布為：公馬總共 26 匹，母馬總共 6 匹，依照組別分別為：出血蛇毒免疫組(公 21/24 匹；母 3/24 匹)、百步蛇毒免疫組(公 4 匹；母 2 匹)及鎖鏈蛇毒免疫組(公 1 匹；母 1 匹)，其中公馬均已結紮。所有馬匹年齡範圍均介於 4 至 10 歲。

2. 免疫組別：

出血組別免疫原料為龜殼花粗毒（批號:Tmt960131 及 Tmt 981130）及赤尾鮎粗毒（批號：960324）、百步蛇毒免疫組則免疫百步蛇毒粗毒（Dat960329），；鎖鏈蛇毒免疫組為鎖鏈蛇毒粗毒（RT960330）。

3. 免疫毒備製方法：

將粗毒或已進行無毒化後之粗毒與佐劑等體積充分完全混合，第一次免疫注射佐劑使用種類為佛氏完全佐劑（Freund's complete adjuvant），往後的每次免疫及追加免疫時則以佛氏不完全佐劑（Freund's incomplete adjuvant）混合。

4. 馬匹進行蛇毒抗原免疫

將混合均勻乳劑狀之蛇毒，微量多處注射於馬匹之背脊兩側皮下，每匹馬約 3-5 mL(Chotwivatthanakun *et al.*, 2001; Sriprapat *et al.*, 2003)。每二週免疫一次，逐次提高劑量，免疫開始12週後，每相隔二週採取少量血清測試其中和抗體力價，抗出血及抗百步蛇蛇毒免疫馬匹其每毫升抗蛇毒血清均達60田中抗毒單位（Tanaka Units, TU）而抗鎖鏈蛇蛇毒馬匹血清其每毫升抗蛇毒血清力價則達80國際單位（International Units, IU）以上之馬匹即可部分採血。

部分採血依照馬匹體重的 $1.75 \pm 0.25\%$ 比例，決定採血的重量。馬匹部分採血後休息2~4週，將依免疫時程第12週時之蛇毒劑量開始繼續免疫。二週後進行試血測其效價，直至出血和百步抗蛇毒血清力價均達60 TU/以上；鎖鏈蛇抗蛇毒

血清力價則達80國際單位 (Huang *et al.*, 1985; Liao, 1987)。採血後經過隔夜靜置血液呈現血漿血球分離，再利用血漿壓板取上層血漿後，下層血球部分加入0.9%生理食鹽水補足後，再回灌至原採血馬匹體中。

5. 採樣時間及方式：

於今年四月中至十一月底共出差 16 次，於每兩週出差時進行馬匹試血，採血方式為馬匹頸靜脈採血。

6. 檢驗項目：

血液檢查項目包含：

檢測項目包含：HCT、HGB、MCHC、WBC、GRANS、L/M、PLT、FIBR，其中 HCT、HGB、MCHC 為紅血球相狀態判讀資料依據、WBC、GRANS、L/M 為白血球相狀態判讀資料依據。所抽取之血液以 EDTA 抗凝，在四小時內進行檢測，所使用儀器為愛德士獸醫專用乾式血液分析儀 (the Diagnostic Health Profile for the VetTest hematology analyzer)，而該儀器需每日以 calibration rod 校正，確保儀器數據的準確度。

血液生化值檢測方面：

檢測項目包含 ALB、ALKP、CK、BUN、CREA、Glob、AST (SGOT)、TP、GGT，其中 ALB、Glob、GGT 為血中蛋白狀態判讀資料依據；BUN、CREA 為腎功能判讀資料依據；AST (SGOT) 及 CK 值為肌肉狀態判讀資料依據；ALKP 及 GGT 為肝臟功能狀態判讀依據。所抽取之血液以 heparin 抗凝，之後進行血清離心分離取上層血清。所使用儀器為愛德士獸醫專用生化分析儀 (IDEXX Lab.的 the Diagnostic Health Profile for the VetTest chemistry analyzer)。

結果

一、 依不同免疫蛇種分組比較其血液生化值：

共收集本局於后里馬場所飼養馬匹 32 匹，依照免疫蛇毒不同分成三大群組，分別為：出血蛇毒免疫組(24 匹)、百步蛇毒免疫組(6 匹)及鎖鏈蛇毒免疫組(2 匹)。血球 Complete Blood Count (CBC) 檢測次數共 261 次，平均出血 7.5 次/匹 (180/24)、百步 9 次/匹 (54/6) 及鎖鏈 13.5 次/匹(27/2)；生化值部份檢驗次數共 207 次，出血 6 次/匹 (144/24)、百步 7.3 次/匹 (44/6) 及鎖鏈 9.5 次/匹(19/2)；同時並收集新進馬匹免疫前血球 Complete Blood Count (CBC) 值資料當作未免疫前馬匹血球 Complete Blood Count (CBC) 基本值共 9 匹次。

未免疫馬匹之 HCT 平均值為 42.32%，免疫後的馬匹之 HCT 均有下降趨勢，所有免疫馬匹 HCT 平均值為 38.23%，其中以免疫百步蛇組其最高 HCT 平均值 (38.89±5.79%) 最高，免疫鎖鏈蛇毒組次之 (38.24±5.96%)，免疫出血組別平均值最低 (38.23±5.99%)，統計上免疫百步蛇毒組馬匹於免疫前後無顯著差異 ($P > 0.01$)，其他鎖鏈跟出血免疫前後均有顯著差異 ($P < 0.01$)；在血紅素 HGB 部分免疫前平均值為 15.54±1.00g/dL，免疫後所有馬匹及個別免疫蛇毒馬匹均有下降趨勢(介於 14.02±2.17g/dL 至 14.90±12.34g/dL)，其中免疫鎖鏈蛇毒組平均值最低 (14.02±2.17g/dL) 且免疫前後比較有統計上的顯著差異 ($P < 0.01$)、百步蛇毒組次之 (14.26±2.12g/dL)，出血蛇毒組最高 (14.90±12.34g/dL)，但免疫出血蛇毒其族群中標準差範圍最大，代表出血族群中個體差異變化最大。

在白血球 (WBC) 部分：其中只有免疫前馬匹之白血球總數 (9,200/ul) 介於正常參考值中，而馬匹開始免疫後全部免疫馬匹或是不同蛇毒組別，其白血球平均值均超過正常值，其中以免疫鎖鏈蛇毒組別馬匹最高 (15,650/ul)，出血次之(13,390/ul)，百步最低(12,830/ul)，且無論免疫何種蛇毒，其免疫前後白血球總數均有顯著差異 ($p < 0.01$)。在血小板部份則全部免疫馬匹或是不同蛇毒組別在免疫前後均無顯著差異 ($P > 0.01$)。

在血球蛋白 (TP、ALB 及 GOLB) 部分，無論何種免疫蛇毒組別及所以所有免疫馬匹其 TP、ALB 及 GOLB 之平均值均高於馬匹正常參考值，但各組並無顯著差異 ($P > 0.01$)。

另比較對馬匹炎症反應特異性高的Fibrogen 指數，結果發現免疫後所有馬匹 fibrogen 平均值為 128.38 mg/dL，再比較各組馬匹免疫後 Fibrogen 差異，發現免疫出血蛇毒之馬匹 fibrogen 最高(142.20±272.90 mg/dL)也高於平均值，鎖鏈次之(102.76±51.88 mg/dL)，而百步最低(96.24±32.53 mg/dL)。免疫百步蛇毒組別在發炎指數指標(WBC 及 fibrogen)中均為各蛇毒組別最低。

表一：不同蛇種免疫馬匹之血液 CBC 值比較 (MEAN±SE)

CBC	免疫前 (9)	出血 (24)	百步 (6)	鎖鏈 (2)	所有馬匹 (32)
HCT (32.0-52.0 %)	42.32±2.74	38.23±5.99 #	38.89±5.79	38.24±5.96 #	38.23±5.92
HGB (11.0-19.0 g/dL)	15.54±1.00	14.90±12.34	14.26±2.12	14.02±2.17 #	14.64±10.43
MCHC (30.0-36.9 g/dL)	36.73±0.09	36.67±0.24	36.68±0.08	36.67±0.16	36.67±0.21
WBC (6-12.50 K/ul)	9.21±1.00	13.39±3.81 #	12.83±3.07 #	15.66±5.39 #	13.48±3.96
GRANS (2.8-8.0 K/ul)	5.41±1.04	9.31±3.39	8.63±2.81	10.84±4.57	9.35±3.49
GRANS %	59.93±12.93	68.56±8.94	66.54±8.82	67.94±7.60	68.35±8.66
L/M (2.1-7.0 ×10 ⁹ /L)	3.69±1.23	4.089±1.32	4.189±1.09	4.79±1.22	4.13±1.24
L/M%	39.89±13.02	34.75±45.62	33.49±8.82	32.15±7.54	34.01±38.60
PLT (90-350 K/ul)	253.33±57.18	264.8±91.74	277.85±75.38	297.41±59.61	269.89±86.79
FIBR (200-450 mg/dL)	-	142.20±272.90	96.24±32.53	102.76±51.88	128.38±230.67

統計上顯著差異 (p<0.01)：#

在生化值部份：腎功能指數(BUN 及 Creatine)部分，所有免疫馬匹及各種蛇毒馬匹平均值均介如正常參考值中。比較各種免疫蛇毒組發現：免疫鎖鏈蛇組別其兩種腎功能指數之生化平均值均高於其他出血及百步兩組平均值。BUN 部分：免疫鎖鏈蛇毒組其平均值為(17.53±4.05 mg/dL)與平均值最低的免疫百步蛇毒組別 (14.11±3.84 mg/dL) 呈現統計上顯著差異($p < 0.01$)，但與免疫出血組別並無顯著差異($P > 0.01$)；在 Creatine 部份鎖鏈蛇其平均值 (1.58±0.30mg/ dL) 高於所有免疫馬匹平均值 (1.49±1.07mg/ dL) 及其他兩種蛇毒組別 (出血：1.40±0.29 mg/dL；百步：1.45±0.35 mg/dL)，但比較各組間在統計上並無顯著差異。

在肝功能指數方面(ALKP 及 GGT)部分，所有免疫馬匹其平均值均介如正常參考值中。比較各種免疫蛇毒組發現其兩項肝功能指數均在正常參考值中，但比較各組平均值中發現在 ALKP 部分以免疫鎖鏈蛇毒組別之平均值 (188.68±73.80 U/L) 為三種中最高，但各組間並無顯著差異；而 GGT 平均值部分以免疫出血性蛇毒組別為最高(40.87±47.40 U/L)，百步蛇毒組次之(31.80±16.12 U/L)，而鎖鏈蛇毒組別平均值為最低(20.21±16.53 U/L)，經過統計鎖鏈蛇毒 GGT 值明顯低於其他兩組呈現顯著差異($P < 0.01$)。

肌肉損傷指數方面(AST 及 CK)部分，所有免疫馬匹其平均值均介如正常參考值中。比較各組間差異發現鎖鏈蛇毒組別之 AST 平均值為三組平均值中最高 (285.21±116.62 U/L)；出血組別次之(216.87±69.25 U/L)；百步組別最三組中最低(196.27±65.91 U/L)，且 AST 平均值最高之鎖鏈蛇毒組與 AST 平均值最低百步蛇毒組，在組別間呈現顯著差異($P < 0.01$)。另外另一重要肌肉損傷指數 CK 值，發現鎖鏈蛇毒組別之 CK 平均值亦為三組平均值中最高 (133.42±103.96 U/L)；百步次之 (119.21±73.39 U/L)；出血組別最三組中最低 (91.72±87.85 U/L)，但統計上三組 CK 值並無明顯差異($P > 0.01$)。

表二：不同蛇種免疫馬匹之血液生化值比較 (MEAN±SE)

生化值	免疫前 (9)	出血 (24)	百步 (6)	鎖鏈 (2)	所有馬匹 (32)
BUN (10-25 mg/dL)	-	15.49±4.21	14.11±3.84	17.53±4.05 #	15.44±4.18
CREA (0.8-2.2 mg/dL)	-	1.40±0.29	1.45±0.35	1.58±0.30	1.49±1.07
TP (5.6-7.9 g/dL)	-	9.01±0.80	9.13±0.66	8.97±0.79	9.05±0.76
ALB (1.9-3.2 g/dL)	-	3.54±0.40	3.62±0.34	3.36±0.37	3.54±0.39
GLOB (2.4-4.7 gg/dL)	-	5.76±3.62	5.51±0.54	5.63±0.71	5.72±3.077
AST (100-600U/L)	-	216.87±69.25	196.27±65.91	285.21±116.62 #	221.04±78.51
ALKP (10-326 U/L)	-	169.02±73.23	174.64±66.17	188.68±73.80	172.68±72.59
GGT (0-87 U/L)	-	40.87±47.40	31.80±16.12	20.21±16.53 #	37.75±41.34
CK(10-350 U/L)	-	91.72±87.85	119.21±73.39	133.42±103.96	101.38±88.29

統計上顯著差異 (p<0.01)：#

再比較鎖鏈蛇毒馬匹組別在免疫時及停止免疫後腎功能指數變化情形如表三，結果發現鎖鏈蛇毒組的馬匹在停止免疫後時，其兩項腎功能指數均較免疫時下降，且免疫前後兩組間之BUN呈現顯著差異 (P<0.01)。而停止免疫期間的鎖鏈蛇毒馬匹群組其腎功能指數與其他免疫群組並無顯著差異。

表三：鎖鏈蛇毒組馬匹在免疫期間及停止免疫後腎指數情形。(MEAN±SE)

CBC	免疫時	停止免疫時	所有馬匹
BUN (10-25 mg/dL)	20.38±1.85	15.1±4.01	15.44±4.18
CREA (0.8-2.2 mg/dL)	1.73±0.41	1.47±0.13	1.49±1.07

統計上顯著差異 (p<0.01)：#

二、免疫出血性蛇毒有無經過 glutaraldehyde (GA) 處理之新進馬匹比較：

今年五月起開始進入免疫的新進馬匹共有 9 匹，該 9 匹馬匹平均年齡為 3 至 4 歲，且均為公馬已結紮。其中編組進入出血性蛇毒組共有 6 匹，這 6 匹中有 3 匹免疫龜殼花粗毒時沒有經過 GA 處理，另外有 3 匹免疫龜殼花粗毒時有經過 GA 處理，比較兩組間馬匹血液生化值差別。

結果如表四，發現兩組馬匹在免疫過程中其 WBC 及顆粒球平均值均高於正常參考值。在血球蛋白 (TP、ALB 及 GOLB) 部分，無論有無經 GA 處理之組別其 TP、ALB 及 GOLB 之平均值均高於馬匹正常參考值，但兩組間並無顯著差異 ($P > 0.01$)；此外未經 GA 處理之馬匹其 GGT 平均值 (93.24 ± 58.61135 U/L) 高於正常參考值。而其他指數均在正常值範圍間。

比較兩組之間差異發現，未經 GA 處理之馬匹其腎功能指數 (BUN)、肝功能指數 (ALPK 及 GGT) 及 AST 之平均值均大於經 GA 處理之馬匹，其中在 BUN、GGT 及 AST 在兩組之間有統計上的顯著差異 ($P < 0.01$)；而經 GA 處理之馬匹發炎指數 (WBC 及 fibrogen) 之平均值均高於未經 GA 處理之馬匹，且兩組別之間的 WBC 在統計上亦有顯著差異 ($P < 0.01$)。

表四：新進免疫出血性蛇毒有無經 GA 處理之馬匹血液生化值 (MEAN \pm SE)

血液生化值	未經 GA 處理(3)*	經 GA 處理(3)*
HCT (32.0-52.0 %)	39.38 \pm 4.94	38.17 \pm 4.95
HGB (11.0-19.0 g/dL)	14.45 \pm 1.82	13.99 \pm 1.81
MCHC (30.0-36.9 g/dL)	36.70 \pm 0.10	36.66 \pm 0.12
WBC (6-12.50 K/ul)	12.52 \pm 2.65	16.54 \pm 3.48 #
GRANS (2.8-8.0 K/ul)	9.22 \pm 1.94	12.05 \pm 3.40
GRANS %	73.64 \pm 4.77	71.89 \pm 7.68
L/M (2.1-7.0 $\times 10^9$ /L)	3.32 \pm 1.00	4.53 \pm 1.05
L/M%	26.06 \pm 4.32	44.72 \pm 100.63
PLT (90-350 K/ul)	325.47 \pm 100.79	263.47 \pm 77.42
FIBR (200-450 mg/dL)	99.82 \pm 46.92	169.77 \pm 347.19 #

BUN (10-25 mg/dL)	18.86±5.02	14.59±4.01 #
CREA (0.8-2.2 mg/dL)	1.38±0.351	1.29±0.32
TP (5.6-7.9 g/dL)	9.53±0.75	9.15±0.45
ALB (1.9-3.2 g/dL)	3.60±0.48	3.55±0.48
GLOB (2.4-4.7 gg/dL)	5.9±0.44	5.55±0.64
AST (100-600U/L)	279.86±62.61	195.05±51.67 #
ALKP (10-326 U/L)	212.19±73.44	193.64±52.08
GGT (0-87 U/L)	93.24±58.61135	15.5±14.07 #
CK(10-350 U/L)	89.27±40.43594	89±61.50

統計上顯著差異 ($p < 0.01$): #

*出血粗毒未經 GA 處理及經 GA 馬匹組別分別於免疫開始後第六週及第十二週各有一匹馬離開實驗。

三、不同蛇毒經 glutaraldehyde (GA) 無毒化後之血液生化值比較

出血性蛇毒經 GA 無毒化之免疫馬匹為今年新進馬匹共 2 匹，而鎖鏈蛇毒經無毒化之免疫馬匹有 2 匹，其中一匹為今年新進馬匹而另一匹則為未免疫休養一段時間的舊馬。兩組免疫開始時間相同。

結果如表五，發現免疫經過 GA 處理蛇毒之免疫馬匹，其紅血球部分平均值與所有免疫馬匹無明顯差別，而其白血球相平均值（出血： 16.54 ± 3.48 K/uL；鎖鏈： 15.66 ± 5.39 K/uL）均高於所有免疫馬匹平均值（ 13.48 ± 3.96 K/uL）且具有顯著差異 ($P < 0.01$)。

在生化值部分兩個無毒化群組之馬匹，除了總蛋白、白蛋白及球蛋白部分，其平均值均高於參考值外，其餘生化平均值均落在正常馬匹範圍內。再比較不同蛇種間的差異，發現免疫鎖鏈蛇種馬匹其腎功能指數平均值(BUN、Creatine)及肌肉損傷指數平均值(AST 及 CK 值)均高於免疫出血性族群及所有免疫馬匹，但無顯著差異 ($P > 0.01$)。但比較特別是有經 GA 處理過之馬匹其 GGT 平均值（出血： 15.5 ± 14.07 U/L；鎖鏈： 20.21 ± 16.53 U/L），均明顯低於所有免疫馬匹 GGT 平均值（ 37.75 ± 41.34 U/L）且兩組分布與所有馬匹分布呈現顯著差異 ($P < 0.01$)，推測可能經 GA 無毒化處理過的蛇毒對馬匹在肝功能方面的傷害降低。

表五：出血及鎖鏈免疫群組經 GA 處理過之免疫馬匹血液生化值 (MEAN±SE)

CBC	免疫前 (9)	出血無毒化後(3)	鎖鏈無毒化後(2)	所有免疫馬匹 (32)
HCT (32.0-52.0 %)	42.32±2.74	38.17±4.95	38.24±5.96	38.23±5.92
HGB (11.0-19.0 g/dL)	15.54±1.00	13.99±1.81	14.02±2.17	14.64±10.43
MCHC (30.0-36.9 g/dL)	36.73±0.09	36.66±0.12	36.67±0.16	36.67±0.21
WBC (6-12.50 K/ul)	9.21±1.00	16.54±3.48 #	15.66±5.39 #	13.48±3.96
GRANS (2.8-8.0 K/ul)	5.41±1.04	12.05±3.40	10.84±4.57	9.35±3.49
GRANS %	59.93±12.93	71.89±7.68	67.94±7.60	68.35±8.66
L/M (2.1-7.0 ×10 ⁹ /L)	3.69±1.23	4.53±1.05	4.79±1.22	4.13±1.24
L/M%	39.89±13.02	44.72±100.63	32.15±7.54	34.01±38.60
PLT (90-350 K/ul)	253.33±57.18	263.47±77.42	297.41±59.61	269.89±86.79
FIBR (200-450 mg/dL)		169.77±347.19	102.76±51.88	128.38±230.67
BUN (10-25 mg/dL)		14.59±4.01	17.53±4.05	15.44±4.18
CREA (0.8-2.2 mg/dL)		1.29±0.32	1.58±0.30	1.49±1.07
TP (5.6-7.9 g/dL)		9.15±0.45	8.97±0.79	9.05±0.76
ALB (1.9-3.2 g/dL)		3.55±0.48	3.36±0.37	3.54±0.39
GLOB (2.4-4.7 gg/dL)		5.55±0.64	5.63±0.71	5.72±3.077
AST (100-600U/L)		195.05±51.67	285.21±116.62	221.04±78.51
ALKP (10-326 U/L)		193.64±52.08	188.68±73.80	172.68±72.59
GGT (0-87 U/L)		15.5±14.07 #	20.21±16.53 #	37.75±41.34
CK(10-350 U/L)		89±61.50	133.42±103.96	101.38±88.29

統計上顯著差異 (p<0.01)：#

*出血粗毒經 GA 馬匹組別分別於免疫開始後第十二週有一匹馬離開實驗。

四、比較不同酸鹼值下使用 Formalin 進行出血性粗毒無毒化對馬匹生理生化值影響

該實驗選用舊有馬匹隨機分成兩組在免疫過程中使用不同酸鹼值緩衝液，利用 formalin 進行出血性蛇毒無毒化，比較各組實驗前後血液生化值變化情形。所選用馬匹共 7 匹，共分成使用高 pH 值(3 匹)及低 pH 值(4 匹)進行 formalin 粗毒無毒化兩組。

結果如表六，發現無論在何種 pH 值下進行 Formalin 無毒化之組別，其紅血球指數 (HCT 及 HGB)平均值均較免疫前略低，其中以高 pH 值組別之的 HCT 下降幅度最為明顯(免

疫前 40.5±4.95%；免疫後 36.6±8.08%）其下降幅度最為明顯且其平均值低於全體馬匹平均值(38.23±5.92%)，但統計上並無顯著差異(P>0.01)。

在白血球部分及血小板平均值部分，免疫前後並無顯著差異。

兩個無毒化群組之馬匹在免疫後之生化值，除了總蛋白、白蛋白及球蛋白部分，其平均值均高於參考值外，其餘生化平均值均落在正常馬匹範圍內。

在腎功能指數部分（BUN 及 Creatine）發現不論何組在免疫後其腎功能指數均低於免疫前，但並無顯著差異(P>0.01)；其他在肝功能指數部分：無論經高低酸鹼值無毒化處理後免疫馬匹之 ALKP 及 GGT 平均值均高於免疫前平均值，其中以高 pH 值其 ALKP 上升幅度最高，但統計上並無顯著差異。另外在肌肉損傷指數中，有些指數於免疫後有上升趨勢但不具有統計差異。

表六：不同酸鹼值進行出血性粗毒無毒化之馬匹生理生化值 (MEAN±SE)

	高 pH 值免疫前	高 pH 值免疫後	低 pH 值免疫前	低 pH 值免疫後	免疫馬匹 (32)
HCT (32.0-52.0 %)	40.5±4.95	36.6±8.08	42.78±1.26	41.5±2.75	38.23±5.92
HGB (11.0-19.0 g/dL)	14.87±1.81	13.44±2.96	15.7±0.48	15.23±1.01	14.64±10.43
MCHC (30.0-36.9 g/dL)	36.72±0.08	36.82±0.29	36.7±0.08	36.68±0.07	36.67±0.21
WBC (6-12.50 K/ul)	15.68±1.92	14.84±1.86	11.35±0.93	11.21±1.42	13.48±3.96
GRANS (2.8-8.0 K/ul)	9.68±3.17	10.13±2.63	7.25±0.93	7.41±1.05	9.35±3.49
GRANS %	60.48±13.64	67.64±12.35	63.75±4.56	66.18±5.55	68.35±8.66
L/M (2.1-7.0 ×10 ⁹ /L)	6±1.33	4.71±1.60	4.1±0.43	3.8±0.84	4.13±1.24
L/M%	39.6±13.56	32.45±12.32	36.5±4.5	33.93±5.56	34.01±38.60
PLT (90-350 K/ul)	271.8±157.77	258.11±129.43	282±44.45	260.2±67.05	269.89±86.79
FIBR (200-450 mg/dL)	104.17±32.56	92.09±22.25	102.25±23.70	102.8±36.90	128.38±230.67
BUN (10-25 mg/dL)	19±1.73	13.71±3.30	20±1.15	12.69±3.04	15.44±4.18
CREA (0.8-2.2 mg/dL)	1.73±0.12	1.14±0.08	1.85±0.24	1.39±0.15	1.49±1.07
TP (5.6-7.9 g/dL)	9.83±1.27	8.97±0.63	9.95±0.29	8.82±0.49	9.05±0.76

ALB (1.9-3.2 g/dL)	4.03±0.38	3.3±0.26	4.28±0.55	3.59±0.21	3.54±0.39
GLOB (2.4-4.7 gg/dL)	5.83±1.12	5.67±0.46	5.55±0.72	5.22±0.60	5.72±3.077
AST (100-600U/L)	110±28.28	183±54.26	160±46.67	207.62±33.33	221.04±78.51
ALKP (10-326 U/L)	155.33±9.24	254.29±154.25	116±36.78	125.31±31.36	172.68±72.59
GGT (0-87 U/L)	30.67±17.62	59.71±54.55	19±4.97	25±4.38	37.75±41.34
CK(10-350 U/L)	89.67±40.27	60.29±12.08	84.5±30.39	103.54±39.76	101.38±88.29

五、馬匹採血前後 HCT 變化及其恢復情形：

於每次採血前，預定採血馬匹會先進行使用毛細管微量離心法進行現場馬匹血液 HCT 測定檢驗，確認馬匹是在合適的身體狀況下始進行採血，如此可確保抗蛇毒血清品質及確保馬匹身體健康。利用 pair t-Test 進行採血前、採血後隔天(回灌前)和採血後兩週馬匹 HCT 變化相關統計分析，並比較採血後有無回灌馬匹恢復情形。本研究共收集今年 2 月起至 11 月底採血馬匹中有完整採血前、採血後 24 小時(回灌前)及採血後兩週完整 HCT 紀錄馬匹共 19 匹，另外有 6 匹未免疫健康採血馬，當成採血後不回灌之馬匹對照組。

結果如表七，對照組因為沒有進行免疫故，其採血前 HCT 平均值(39.33%)略高於有進行免疫的實驗組之 HCT 平均值(36.89%)，且在採血後隔天兩組之 HCT 平均值均較採血前明顯下降，且下降至正常參考值低值邊緣(正常參考值 32%；對照組隔天:31%；採血組隔天:32.74%)，但在經過兩週休息後兩組之 HCT 值平均值均分別上升至正常參考值間(32%-52%)。

經統計分析，發現無論對照組或是實驗組馬匹在採血前及採血後隔天，在 HCT 均有統計上的顯著差異($P < 0.01$)；比較，實驗組及對照組馬匹採血前及採血後兩週在個別族群中 HCT 則無顯著差異，此代表馬匹在採血後兩週無論有無回灌，其 HCT 與採血前並無差別。但比較其兩組採血前及採血後兩週平均值差異，發現未回灌的對照組在採血後兩週其平均值(34.83%)仍未達採血前平均值(39.33%)；反之有回灌實驗組馬匹在採

血後兩週其平均值 (38.47%) 已超過採血前平均值 (36.89%)。由此結果證明雖然在採血後兩週無論有無回灌馬匹，其 HCT 值雖然與已經跟採血前無顯著差異，且都恢復至正常參考值範圍間(32~52%)，但是採血後有回灌馬匹其 HCT 上升速度比未回灌馬匹速度快。

此外發現在採血後兩週後，無論有無回灌之馬匹群組中，仍有馬匹其 HCT 未回復至正常值間；待採血後四周後發現實驗組馬匹只有 5.2%(1/19)比例及對照組馬匹卻仍有 16.6%(1/6)比例之馬匹仍未回復到正常值，該些未恢復馬匹在採血後 6 週檢測其 HCT 均恢復至正常參考值內，可開始再進行下一輪免疫。

表七：採血前後馬匹 HCT 變化情形 (MEAN±SE)

		採血前	採血隔天	採血後 2 周
HCT (32.0-52.0 %)	對照組(6 匹)	39.33±1.86	31	34.83
	實驗組(19 匹)	36.89	32.74	38.47

六、 討論與建議

無論何種蛇毒在開始初次免疫後或是補強免疫後，其紅血球相(HCT 及 HGB)均會呈現些許或是有統計上顯著下降情形。其中以免疫出血性蛇毒（龜殼花及赤尾鮫），其各種紅血球相平均值下降情形均較其他免疫蛇種明顯，這顯示出血性蛇毒容易影響造血功能或是對紅血球進行破壞程度大於其他蛇毒；鎖鏈蛇毒次之，且在免疫前後在統計上也具有顯著差異；而百步蛇是所有蛇種中造成紅血球相下降最不明顯之免疫蛇毒。所以未來在進行出血性蛇毒及鎖鏈蛇毒免疫時，應加強馬匹在免疫過程中紅血球相的監控。

此外在白血球相部分：本次實驗中所有馬匹在免疫後均有白血球相上昇情形時，但其中並未排除一些如蹄葉炎及皮膚感染等特殊狀況馬匹，原因是因為相關問題馬匹均散佈在各種免疫蛇種馬匹中。所以該發炎指數無法區別其發炎指數上升是因為皮膚問題、蹄部問題或是其他身體器官發炎等單方面原因或是多發性原因所造成。只能依照馬匹皮膚外表免疫傷口情況、馬匹蹄部檢查及其他生化值等方式來排除並找出發炎原因給予治療。

在腎功能指數(BUN 及 Creatine)部份，被鎖鏈蛇毒免疫後之馬匹，其兩種腎指數平均值高於其他兩種蛇毒及所有免疫馬匹平均值。這與被鎖鍊蛇所咬傷病人，可引發急性腎衰竭之特殊病徵，或許有些許相同症狀關聯。在馬匹免疫過程中是有造成腎指數些許上升但還不至於造成馬匹有急性腎衰竭情形發生，推測可能與在免疫過程中有先進行鎖鏈蛇毒的無毒化，且免疫劑量與實際咬傷蛇毒量，以及馬匹及人類體重差異等有關。由生化數據可以看出在鎖鏈蛇毒免疫過程中的確是會造成馬匹腎功能指數數值的升高，但在停止免疫時，馬匹的腎功能指數又回復到與其他免疫馬匹沒有差異，推測可能現階段所施打的鎖鏈蛇免疫計畫對馬匹的腎臟可能有短期間但是具有可恢復性的影響，而非永久性的影響。

針對肝功能指數部分，此兩組經高低酸鹼值和 Formalin 處理無毒化之免疫群組以下簡稱 HF 及 LF) 舊馬與有無 GA 處理之出血性新進馬匹（以下簡稱 GA 及 nonGA）比較發現，經 GA 處理過的馬匹其 GGT 為四組最低（平均值：GA < LF < HF < nonGA），高 pH 值組別其 ALKP 平均值為四組最高（平均值：LF < GA < nonGA < HF），又以馬匹在臨床表現有高 GGT 馬匹比高 ALKP 馬匹癒後狀況較差。以現有數據可得知出血性蛇毒有經過無毒化處理，對肝功能方面可能還是具有保護作用，而利用 GA 處理又比 Formalin 處理為佳，

若是利用 Formalin 處理則低 pH 值處理較高 pH 值處理為佳。但遺憾的是，經過各種無毒化處理之出血群組馬匹其力價表現並不佳，每毫升抗蛇毒血清力價均未達 60 田中單位。

在出血及鎖鏈蛇無毒化馬匹群組間比較，發現在部分生化指數（肌肉及腎功能）平均值中，鎖鏈蛇免疫群組其相關指數雖然均正常參考值範圍內，但仍均高於免疫出血性族群及所有免疫馬匹群組。因其無毒化的方法及 GA 濃度皆同於出血性群組，推測是否鎖鏈蛇毒生物特性特殊所以即使經過無毒化也是容易造成相關功能指數上升，如此增加無毒化 GA 濃度是否可以成功降低鎖鏈蛇毒在免疫過程對生物體的影響呢？但是因為 GA 本身也是對馬匹具有相當毒性，兩相權衡取其輕，在蛇毒及 GA 無毒化使用上的比例拿捏上還需要實驗數據支持。

本次實驗中有些馬匹為舊有馬匹，已經有過免疫注射，雖然每次分組實驗中有經過一段時間休息，但其在實驗過程中所反映出的血液生化值可能不像新進馬匹一樣單純為初次實驗反應。究竟舊有馬匹在當下實驗血檢值反應，身體狀況是否有受到前次實驗影響或是多次累積實驗影響，實際上無法清楚切割或區別。因為馬匹為昂貴的實驗動物，無法每次實驗均使用未曾免疫之新馬，為了避免前後實驗間交互影響，只能延長馬匹在每次實驗間的休養待用時間，並在每次新實驗開始前先進行馬匹全面體檢當作該次實驗馬匹狀況背景值或是以全體馬匹基本資料為母體背景進行分析比較。

關於馬匹採血後有血液回灌之馬匹其所需恢復期較血液未回灌馬匹短，而採血後馬匹建議至少需要兩周至六周的恢復期，馬匹才建議可開始進行下一次免疫。

根據上述討論可依照各種不同蛇毒免疫馬匹在（1）免疫前後血液生化值有無統計上顯著差異，以及（2）其族群平均值是否超過正常參考值，（3）其免疫過程中指數下降或上升值為各種蛇毒免疫中最為明顯等條件，可列出各種蛇毒在免疫過程中，所應特別注意之血液生化值，出血蛇毒群組：應加強注意紅白血球及肝功能中 GGT 指數；百步蛇毒群組：應加強注意紅白血球；鎖鏈蛇毒群組：應加強注意紅白血球、腎功能(BUN 及 Creatine)及肌肉損傷指數（AST 及 CK）。如下表：

CBC	出血	百步	鎖鏈
HCT	V		V
HGB			V
WBC	V	V	V
GRANS			
PLT			
FIBR			
BUN			V
CREA			V
TP	V	V	V
ALB	V	V	V
GLOB	V	V	V
AST			V
ALKP			V
GGT	V		
CK			V

此外針對上述各組需特別注意相關身體生化指數之馬匹，除定期進行體檢外，並於馬匹飲食中額外補充綜合維他命及特別再添加維他命 B 群於馬匹精料中，以預防馬匹貧血發生；此外在不影響馬匹正常免疫及採血前相關藥物停藥期之前提下，於每次馬匹免疫前可先進行馬匹傷口照護處理，並視情形佐以抗生素治療或其他肝功能保健用藥及相關營養補充針劑或藥物之給予，並視馬匹情況可直接停止免疫並列入休養，待其傷口或相關身體相關功能指數恢復正常後再開始進入免疫群組。另外針對如鎖鏈蛇毒等容易造成免疫馬匹之較明顯之腎功能指數或是肌肉損傷或發炎指數上升之情形，可於馬匹免疫採血後延長其休養時間，待馬匹相關功能指數恢復後，再進行下次的馬匹免疫。

參考文獻

1. Angulo Y, Estrada R, Gutierrez JM. Clinical And Laboratory Alterations In Horses During Immunization With Snake Venoms For The Production Of Polyclonal (crotalinae) Antivenom. TOXICON. 1997, 35 : 81-90.
2. Chang LS, Lin R, Chen KC, Chang CC. Enrichment of the antibodies against the C-terminus of Taiwan cobra cobrotoxin using dimeric glutaraldehyde-modified toxin as an immunogen. Toxicon . 2003, 41 : 181–186.
3. Eugeniusz W, Janusz D, Anderzej L. Nutritional immunity in horses. Bull. Vet. Inst.
4. Hodgson WC, Wickramaratna JC. 2006. Snake venoms and their toxins: An Australian perspective Wayne C. Hodgson, Janith C. Wickramaratna. Toxicon. 48 : 931-940.
5. Huang RJ, SW Chen, TK Chen, MY Liau. The detoxification of Naja naja atra venom and preparation of potent antivenin. Chin J Microbial Immnuol 1985, 18:21-7.
6. Liau, MY. Preparation of highly potent Naja naja atra (Formosa cobra) antivenom. Chin J Microbial Immnuol 1987, 11:117-21.
7. Lalloo DG, David R, Theakston G. Snake Antivenoms. Journal of Toxicology Clinical Toxicology. 2003, 41 : 277-290.
8. Winkel KD, Mirtschin P, Pearn J. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. Toxicon 2006, 48. 738–754.
9. 黃瑞禎、廖明一、陳淑惠、陳村光。高效價出血性抗蛇毒血清之製備。中華醫誌，1986，37：410-5。
10. 廖明一、黃瑞禎、陳淑惠、繆伯齡、陳村光、張盛進。台灣飯匙倩蛇毒類毒素之製備。中華醫誌，1990，46：1-6。
11. 劉健信、江大雄、連偉成、劉定萍。2002–2005 年台灣地區使用抗蛇毒血清的流行病學分析。疫情報導，2009 年 7 月。