

2006 年動物布氏桿菌病診斷與血清抗體監測

黃淑敏*、黃春申、郭靜蕙、吳義興、張惟茗、趙馨華

行政院農委會家畜衛生試驗所
臺北縣淡水鎮中正路 376 號

摘要 針對 2006 年台灣地區肉用牛及乳用牛共篩檢 1,486 例、肉用羊及乳用羊 639 例、台灣大學和屏東科技大學附設動物醫院送檢之輸入犬 165 例以及衛生署疾病管制局送檢之疑似本病病人 3 例之血清檢體，以玫瑰苯凝集試驗(Rose bengal test, RBT)進行初 檢測，其陽性及疑陽性者再以補體結合試驗(Complement fixation test, CFT)進行複檢。結果，在犬隻有 10 例 (6.1%)呈陽性反應，皆為國外輸入犬隻；肉用牛及乳用牛、肉用羊及乳用羊及人的樣本均呈陰性反應。抗體檢測結果顯示截至 2006 年台灣地區之肉用牛及乳用牛、肉用羊及乳用羊及人皆無布氏桿菌病之感染。〔*聯絡人 TEL:02-26212111，Fax:02-26225345，E-mail:smhuang@mail.nvri.gov.tw〕

關鍵字：布氏桿菌病、玫瑰苯凝集試驗、補體結合試驗

緒言

國內乳牛布氏桿菌病已於 1898 年清除，並於 1991 年正式向國際發表報告。乳羊布氏桿菌病自 1986 年開始大量檢測，迄今經 20 年之檢查均為陰性，證明我國羊隻並未有本病之污染。布氏桿菌是由 *Brucella* spp. 所引起，可傳染多種動物，如綿羊、山羊、鹿、豬、狗等。人類在接觸到病畜或污染本菌之畜產品後亦可能感染此病，而呈現感冒症狀如疲倦、肌肉痛、微發熱、夜間盜汗，病程經過很長，且不易治療[11,12]。牛、羊、豬等動物被感染時，症狀為流產、乳房炎、睪丸炎等[1,3,7]。本計劃針對具有感受性宿主以持續性主動及被動式監測方式進行疾病監測，以期在海外新病原入侵時，能在第一時間確診迅速撲滅，防堵疾病入侵之可能。

材料與方法

血清樣本之採集

牛及羊之血清樣本來自各縣市家畜疾病防治所或動物防疫所管轄之畜牧場以定期主動式進行

樣品收集及屠宰肉牛場之定期採樣；犬隻血清樣本來自台灣大學和屏東科技大學動物醫院定期送檢之自國外進口新移入動物血清樣本，人的血清樣本來自衛生署疾病管制局送檢台灣各醫院醫師針對查不出病因且具波狀熱症狀等疑似布氏桿菌病之病患血清樣本。

進口動物冷凍精液細菌分離

自畜試所購買自不同國家、品系、牛隻編號所進口之冷凍精液，以血液培養基培養於 5 至 10 %之 CO₂ 環境及 37°C 溫度，觀察 3 至 5 天以進行細菌分離。

試驗用抗原

玫瑰苯凝集試驗(Rose bengal test, RBT)所用抗原為市售之玫瑰苯布氏桿菌檢測試劑[6,13,15]，肉用牛、山羊、豬及人的血清檢測為使用英國 VLA 生產之流產布氏桿菌全菌抗原[5,12]，而犬血清檢測是使用美國 SYNBIO TICS 所生產之犬布氏桿菌全菌抗原[9]。

補體結合試驗(Complement fixation test, CFT) 在肉用牛、山羊、豬及人的血清檢測所用抗

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

原為日本動物衛生研究所出品之脂多醣抗原，稀釋 100 倍後使用[4,5]。犬血清檢測用抗原為使用犬布氏桿菌標準菌株 ATCC23365 株依照 WHO 手冊方法配製[4]。補體為採集自天竺鼠之混合血清，分裝存於-70℃，使用之力價為可使測定系統產生 50%溶血之 4 倍強度(即 4 單位)。溶血素為抗綿羊紅血球之免疫球蛋白，所購得之 DIFCO 此類產品，其完全溶血力價約為 2,000 倍，因此採其略高力價，稀釋 1:1,500 使用。敏感紅血球為 3%綿羊紅血球與等量之稀釋溶血素混合，存放於 4℃感作隔夜之紅血球。

血清樣品之測定

以 RBT 作為初步篩檢，檢測時以抗原 0.03 ml 加上血清 0.03 ml 於玻璃板上混合震盪 4 分鐘後觀察凝集情形，任何的可視反應都被認為是陽性反應。判定為陽性者再以 CFT 複檢[8,9,10,11]。

CFT 操作為血清先以 60℃30 分鐘進行非動化，再以緩衝液 Barbital Buffer Saline 製成 5 倍稀釋液。在 96 孔盤上連續稀釋 5x, 10x, 20x, 40x, 80x, 160x, 320x, 再順序加入市售稀釋之 1x 抗原和 4 單位補體後置於 4℃隔夜作用。加入敏感紅血球搖晃均勻，之後移至 4℃冰箱 1 小時後進行判讀。判讀分為 5 個等級：4+=完全不溶血，3+=溶血 25%，2+=溶血 50%，1+=溶血 75%及 0=完全溶血。若完全溶血則判定為陰性。

結果

牛隻血清共收集 1,486 例，分別由屏東縣境內 26 個畜牧場收集 376 例、彰化縣境內 12 個畜牧場收集 359 例、雲林縣境內 11 個畜牧場收集 329 例、桃園縣境內 5 個畜牧場收集 116 例、南投縣境內 1 個畜牧場收集 44 例、花蓮縣境內 2 個畜牧場收集 43 例、南投縣境內 1 個畜牧場收集 44 例、新竹縣境內 2 個畜牧場收集 31 例、台東縣境內 1 個畜牧場收集 15 例、主動定

期至屠宰場採樣之血清共計 147 例，及疾病診斷中心轉送 26 例。初步玫瑰苯凝集試驗結果出現 10 例疑陽性病例，再經補體結合試驗檢測血清中抗體反應，其結果皆為陰性，詳如表 1。

羊隻血清共收集 639 例，分別由彰化縣境內 9 個畜牧場收集 401 例、南投縣境內 4 個畜牧場收集 149 例、桃園縣境內 1 個畜牧場收集 30 例、基隆市境內 1 個畜牧場收集 29 例、新竹縣境內 1 個畜牧場收集 15 例及台東縣境內 1 個畜牧場收集 15 例，初步玫瑰苯凝集試驗結果出現 4 例疑陽性病例，再經補體結合試驗檢測血清中抗體反應，其結果皆為陰性，詳如表 2。

犬隻布氏桿菌病之抗體檢測 165 例，包括自外國輸入犬隻血清 158 例，及台灣本國血清 7 例。在初步玫瑰苯凝集試驗結果出現 10 例疑陽性病例，再經補體結合試驗檢測血清中抗體反應，結果呈陽性反應共計 10 例，其檢測血清抗體陽性率及來源國家分別為泰國為 50%、法國為 33.3%、加拿大為 8.3%、美國為 6.3%之陽性率，其他陰性輸入國或地區分別來自夏威夷、香港、丹麥、南非、匈牙利、西班牙、比利時、日本、印尼及菲律賓等國。詳細檢測病例數及陽性率結果詳見表 3。

自畜試所購買自美國、加拿大等國所進口乳牛之冷凍精液共 10 隻，以血液培養基培養於 5 至 10%之 CO₂ 環境 37℃溫度，觀查 3 至 5 天以進行細菌分離，結果皆為陰性詳見表 4。

將 2002 至 2006 年於各動物所檢測之布氏桿菌血清抗體檢測陽性率百分比之結果列於表 5。結果發現臺灣之乳用牛及肉用牛、乳用羊及肉用羊、豬以及人的布氏桿菌之抗體檢測為陰性。依據 2003 至 2005 年臺灣流浪犬之血清監測，一直有 5%之陽性病例出現，顯示台灣有少部分犬隻存有犬布氏桿菌之抗體。

討論

2006年以初步玫瑰苯凝集試驗檢測牛隻及羊隻布氏桿菌之抗體，結果出現在牛隻篩檢部份有10例疑陽性病例；羊隻篩檢部份有4例疑陽性病例，再經補體結合試驗確認血清中抗體反應，結果皆呈陰性反應，因玫瑰苯凝集試驗為一敏感性高而特異性較低之之檢測方法，所以偶爾會出現偽陽性，因此利用高敏感性高特異性的補體結合試驗作為複檢，以排除偽陽性的可能。有些研究指出 *Yersinia enterocolitica* 會對牛布氏桿菌血清學檢查有影響，而產生偽陽性[14]；在本檢測中，除以補體結合試驗作為複檢，應可嘗試針對初步玫瑰苯凝集試驗陽性反應之血清樣品再以分子檢測技術檢測進行檢驗，以確定偽陽性之反應非布氏桿菌所引起。

2006年犬隻布氏桿菌之抗體檢測165例，包括動物醫院檢疫之輸入犬158例及台灣本國血清7例，結果以補體結合試驗確認血清中抗體反應，則於自國外輸入犬隻有10例為陽性。輸入犬陽性者其來源有北美、法國及泰國。北美目前仍為犬布氏桿菌疫區，所以有零星陽性病例檢出並不意外，或是輸入前曾接種過疫苗導致檢出血清陽性，仍有待釐清。此外，本國法規對於犬布氏桿菌陽性犬隻沒有什麼限制，也沒有強制的管理措施，因此檢驗出陽性之犬隻只能告知動物醫院，由動物醫院跟畜主溝通妥善處理。依據2003至2005

年臺灣流浪犬之血清監測，一直有5%之陽性病例出現，顯示台灣有少部分犬隻有犬布氏桿菌之抗體，依據學者的研究[1,2,3]，台灣確實有犬布氏桿菌之存在，但是至今沒有大規模的調查。犬布氏桿菌除了感染犬之外，還有少數感染人的報告[9]。目前飼養寵物風氣盛行，本病亦必須受重視，應擴大監測範圍深入調查，並加強檢體來源之相關資料收集，以管控防止國人感染犬布氏桿菌之風險。

複檢3例人疑似病例，結果皆為陰性。人疑似病例的複檢結果，除了可提供臨床醫師確診用藥的參考外，由於本病為人畜共通傳染病，因此更可由人是否感染此病來進一步推論是否為動物來源之疫病所導致，以作為防疫上監控的考量。

由於流產布氏桿菌(*Brucella abortus*)、馬爾他布氏桿菌(*Br. melitensis*)及豬布氏桿菌(*Br. suis*)的抗原共通性，因此山羊、豬以及人的布氏桿菌病檢測方法是與牛的流產布氏桿菌檢測試驗相同[11,12]。乳羊自1986年開始大量檢驗，至今20年之檢查均為陰性。而豬隻的檢驗2002-2005年共檢驗1,089頭，結果也均為陰性。此外今年亦針對進口動物冷凍精液進行細菌分離，結果皆為陰性，爾後我們也將持續監測，尤其要注意外來動物，特別是走私之野生動物及從其他國家或地區輸入之動物，將布氏桿菌入侵之機會降至最低。

表 1. 2006 年本國牛隻布氏桿菌血清抗體檢測陽性率百分比之分佈

縣市別	畜牧場數	檢測結果(陽性數/總檢驗數)	
		玫瑰苯凝集試驗(RBT)	補體結合試驗(CFT)
屏東縣	26	1.1% (4/376)	0% (0/376)
彰化縣	12	0% (0/359)	0% (0/359)
雲林縣	11	0.3% (1/329)	0% (0/329)
桃園縣	5	0% (0/116)	0% (0/116)
南投縣	1	0% (0/44)	0% (0/44)
花蓮縣	2	0% (0/43)	0% (0/43)
新竹縣	2	0% (0/31)	0% (0/31)
台東縣	1	0% (0/15)	0% (0/15)
主動屠宰場	-*	0% (0/147)	0% (0/147)
疾病診斷中心	-*	19.2% (5/26)	0% (0/26)

*無法提供血清來源區域之資料，致無法追溯。

表 2. 2006 年本國羊隻布氏桿菌血清抗體檢測陽性率百分比之分佈

縣市別	畜牧場數	檢測結果(陽性數/總檢驗數)	
		玫瑰苯凝集試驗(RBT)	補體結合試驗(CFT)
彰化縣	9	0.7% (3/401)	0% (3/401)
桃園縣	1	0% (0/30)	0% (0/30)
南投縣	4	0% (0/149)	0% (0/149)
新竹縣	1	0% (0/15)	0% (0/15)
台東縣	1	0% (0/15)	0% (0/15)
基隆市	1	3.4% (1/29)	0% (0/29)

表 3. 2006 年本國及國外輸入犬隻布氏桿菌血清抗體檢測陽性率百分比之分佈

地區	檢測結果(陽性數/總檢驗數)	
	玫瑰苯凝集試驗(RBT)	補體結合試驗(CFT)
美國	6.3% (5/79)	6.3% (5/79)
加拿大	8.3% (3/36)	8.3% (3/36)
香港	0% (0/8)	0% (0/8)
丹麥	0% (0/8)	0% (0/8)
臺灣	0% (0/7)	0% (0/7)
南非	0% (0/5)	0% (0/5)
夏威夷	0% (0/5)	0% (0/5)
匈牙利	0% (0/4)	0% (0/4)
法國	33.3% (1/3)	33.3% (1/3)
比利時	0% (0/2)	0% (0/2)
泰國	50% (1/2)	50% (1/2)
印尼	0% (0/2)	0% (0/2)
菲律賓	0% (0/1)	0% (0/1)
西班牙	0% (0/1)	0% (0/1)
日本	0% (0/1)	0% (0/1)
韓國	0% (0/1)	0% (0/1)

表 4. 2006 年進口乳牛冷凍精液犬布氏桿菌細菌分離結果

進口國別	進口批次/品系	牛號	細菌分離
美國	7/ Holstein	5366	陰性
	7/ Holstein	5360	陰性
	7/ Holstein	2288	陰性
	7/ Holstein	5048	陰性
	14/ Holstein	2696	陰性
加拿大	39/ Holstein	768	陰性
	73/ Holstein	2886	陰性
	70/ Holstein	1191	陰性
	70/ Holstein	1183	陰性
	14/ Holstein	2687	陰性

表 5. 2002-2006 年各動物之布氏桿菌血清抗體檢測陽性率百分比之結果

動物別 年份	肉用/乳用牛	肉用/乳用羊	豬	犬	人
2002	— ^a	—	0(0/512)	—	—
2003	—	—	0(0/512)	4.9 (19/384) ^b	0 (0/8)
2004	0 (0/744)	0 (0/34)	0 (0/10)	1.2 (9/740) ^c	0 (0/5)
2005	0 (0/568)	0 (0/17)	0 (0/55)	1.7(11/641) ^d	0 (0/5)
2006	0(0/1486) ^e	0(0/639) ^e	—	6.1 (10/165)	0 (0/3)

a：無檢測樣本。

b：384 例皆為動物醫院檢疫中之輸入犬。

c：740 例中有 6 例為流浪犬、734 例為動物醫院檢疫中之輸入犬，9 例陽性皆為輸入犬。

d：641 例包括 300 例流浪犬(其中有 6 例陽性)，以及 341 例動物醫院檢疫之輸入犬(其中有 5 例陽性)。

e：2005 年之前以肉用牛為主。

參考文獻

- 王金和、吳福明、蔡義雄、楊喜吟、呂榮修。台灣牛布氏桿菌病及 *Brucella canis* 人工感染犬之病理變化。台灣省畜衛試研報。17:73-76。1981。
- 吳義興、張惟茗、蕭終融。台灣犬隻布氏桿菌病之檢出。家畜衛試所研報。37:15-18。2001。
- 蔡義雄。台灣地區乳牛及犬布氏桿菌病的研究。日本北里大學博士論文。1982。
- Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in Brucellosis. 2nd ed, Geneva, WHO, 1975.
- Blasco JM, Garin-Bastuji B, Marin CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez de Bagues MP, Cau C. Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet. Rec. 134: 415-420, 1994.
- Bowden RA, Verge JM, Grayon M, Cloeckert A. Rapid identification of rough *Brucella* isolates by a latex coagglutination assay with the 25-kilodalton outer membrane protein and rough-lipopolysaccharide specific monoclonal antibodies. Clinic and Diagnosis Lab. Immunol. 4(5): 611-614, 1997.
- Davis CE, Troy SB. Brucellosis. N. Engl. J. Med. 353(10): 1071-1072, 2005.
- Diaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Perez-Ortiz S, Parado M, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I. Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. J. Clin. Microbiol. 32(5): 1159-1165, 1994.
- Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Bey RF, Andreani E. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. New Microbiol. 26(1): 65-73, 2003.
- Gall D, Nielsen K. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Rev. Sci. Tech. 23(3): 989-1002, 2004.
- Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL. Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assay in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 70(6): 688-694, 2004.
- Lucero NE, Bolpe JE. Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. J. Clin. Microbiol. 36(5): 1425-1427, 1998.
- Morgan WJB, Mackinnon DJ, Lawson JR, Cullen GA. The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec. 85: 636-641, 1969.
- Munoz PM, Marin CM, Monreal D, Gonzalez D, Garin-Bastuji B, Diaz R, Mainar-Jaime RC, Moriyon I, Blasco JM. Efficacy of several serological test and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(1): 141-151, 2005.
- Santos JM, Vestreat DR, Parfra VY and Winter AJ. Outer membrane protein from rough strains of four *Brucella* species. Infect. Immun. 46: 188-194, 1984.

Diagnosis and Survey of Animal Brucellosis in Taiwan

Sue-Min Huang*, Chen-Sheng Huang, Ching-Hui Kuo, Yi-Shing Wu,
Wei-Ming Chang, ¹Parn-Hwa Chao

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan

Abstract The Rose Bengal (RB) test was used as a preliminary screening tool and the complement fixation (CF) test was used as a final confirmation for brucellosis using sera collected from January to December, 2006 in Taiwan. One thousand four hundred and eighty-six, 639 and 165 serum samples were collected from beef and dairy cattle, meat and dairy goats, and quarantined dogs, respectively, from animal hospitals of National Taiwan University and National Ping-Tung University of Science and Technology and 3 serum samples from people collected by Center for Disease Control were submitted to our institute for serologic screening of brucellosis. The results showed that 6.1% (10/165) of quarantined dog's serum samples were tested positive, but the sera from beef and dairy cattle, meat and dairy goats and peoples were tested negative for brucellosis.

Keywords: *Brucellosis, Rose Bengal test, Complement fixation test*

*Corresponding Author
Animal Health Research Institute