

## 以酵素結合免疫吸附 調查台灣牛副結核病抗體

呂榮修 蔡向榮 鄺懋勁 賴淑雅  
李永林 林地發 李全

### 台灣省家畜衛生試驗所

經 *Mycobacterium phlei* 吸附處理過之牛血清以酵素結合免疫吸附法 (ELISA 法) 測定副結核病 (paratuberculosis) 之抗體並與補體結合試驗 (CF) 之結果比較, 結果發現 ELISA 法之特異性較 CF 法極顯著為高 ( $P < 0.005$ )。

以 ELISA 法調查台灣 8 個縣市之 1,003 頭牛之副結核病抗體, 結果發現有 35 頭 (3.48%) 為 ELISA 抗體陽性。

牛副結核病 (Paratuberculosis) 是由 *Mycobacterium paratuberculosis* 所引起的一種慢性肉芽腫性腸炎, 目前在歐、美及日本等許多國家造成重大之經濟損失, (1,2) 爲了解台灣是否有本病之存在及其分布情形, 而以血清學方法。進行調查, 茲將結果報告如下。

#### 材料與方法

1. 供試血清: 利用 74 年度牛布氏桿菌抗體測定陰性血清, 首先由苗栗、台中、雲林、高雄、屏東 5 個縣市抽取 170 個血清供爲補體結合試驗 (CF) 及酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 之比較試驗, 最後再由 8 個縣市抽取 1,003 個血清進行 ELISA 試驗。所有血清保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  備用。

2. 副結核病抗體陰性及陽性牛血清: 由日本家畜衛生試驗場所分讓。

3. 補體結合試驗用抗原: 採用日本家畜衛生試驗場之製品。

4. 補體結合試驗: 依 Yokomizo (5) 之方法, 即先將供試血清在  $58^{\circ}\text{C}$  加熱 30 分鐘後實施, 使用 2 單位之補體及 4 單位之抗原, 在  $4^{\circ}\text{C}$  過夜感作後判讀, 以呈現 50% 或以上阻止溶血現象之稀釋倍數爲 CF 抗體力價, 以抗體力價 1:10 及以上者判定爲陽性。

5. ELISA 用抗原: 係由日本家畜衛生試驗場分讓之粗製原生質內抗原 (crude protoplasmic antigen) (7) 冷凍乾燥於真空瓶內, 使用時以 0.05 M 碳酸緩衝液 (PH 9.5) 稀釋成  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  之濃度。

6. 供試血清處理: 供試血清進行 ELISA 試驗前皆先以 *Mycobacterium phlei* 吸附處理, 其方法仿 Yokomizo (7) 所述, 以 1 ml *M. phlei* 菌液 (日本家畜衛生試驗場分讓之不活化菌液, 每 ml 含 5 mg 乾重菌體) 與  $25\ \mu\text{l}$  供試血清在室溫混合振盪 30 分鐘後, 置於  $4^{\circ}\text{C}$  過夜感作後, 所得之上清液即爲已處理之 40 倍稀釋血清, 供爲 ELISA 試驗。

7. 兔抗牛 IgG1 血清及綿羊抗兔子 IgG

Fc 之免疫酵素標示抗體(Sheep-anti-rabbit IgG Fc horseradish peroxidase conjugate globulin)：皆使用由日本家畜衛生試驗場所分讓之製品。<sup>(6)</sup>

8. 酵素結合免疫吸附法(ELISA法)之實施：本試驗係仿 Yokomizo 之方法<sup>(67)</sup> 實施，即以每個洞(well)添加100  $\mu$ l 前述之 ELISA 用抗原於微量力價測定盤(96F Nunc-Immunoplate II, Inter Med 公司)後於4  $^{\circ}$ C 過夜吸附。然後以含0.05% Tween 80 及0.2% W/V NaCl之0.5M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液(PH7.2)洗滌4次。前述已處理供試牛血清以含0.1% Tween 80, 1M

NaCl, 0.25% gelatin 之0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液(pH7.2)稀釋成最終濃度為1:100倍，陰性血清亦稀釋成1:100倍，陽性血清則自1:100倍起作2倍序列稀釋至1:12,800倍。取各稀釋之血清100  $\mu$ l 添加於已固定有ELISA 抗原之洞中後在室溫振盪5分鐘後再靜置25分鐘，再以前述之洗滌液洗滌3次。然後所有的洞皆加入100  $\mu$ l 兔抗牛IgG1血清(1:500倍稀釋)，在室溫振盪5分鐘後再靜置25分鐘，然後再移入4  $^{\circ}$ C 冰箱靜置1小時後以前述之洗滌液洗滌3次，再在所有的洞內添加100  $\mu$ l 標示抗體(以力價檢定時OD值=1.0之稀釋倍數)後在室溫振

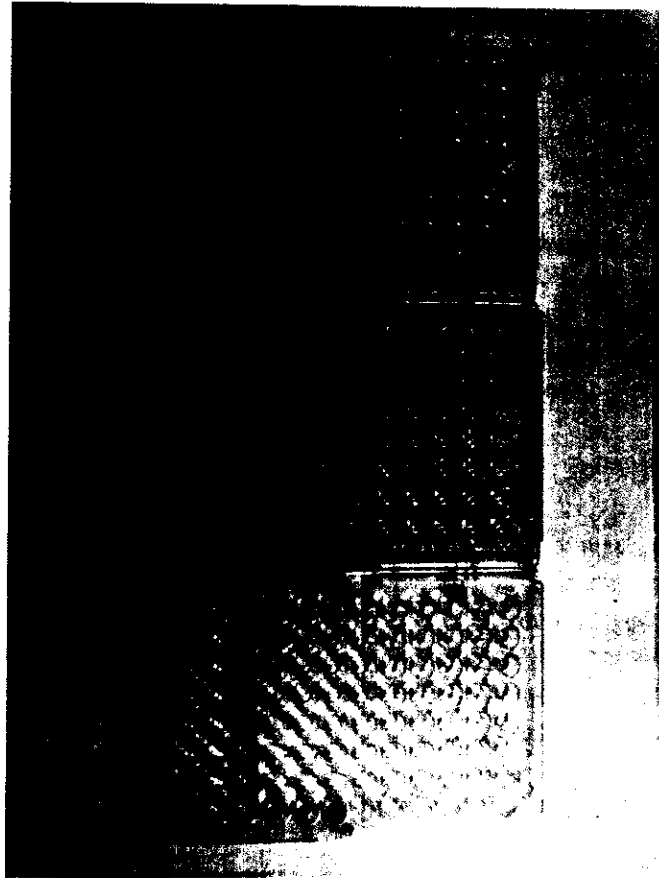


圖1 以ELISA 法測定牛副結核病抗體。每盤左邊第1行為1:100倍稀釋陰性血清對照，第3盤第3行由上而下為1:100~1:12,800倍2倍序列稀釋之陽性血清對照，其餘每個係以1:100倍稀釋之供試血清進行測試。

盪 5 分鐘後再靜置 25 分鐘，再移入 4℃ 過夜感作。第 2 天以洗滌液洗滌 5 次後，每個洞添加 50  $\mu$ l 受質溶液〔每 50 ml 含 20 mg O-phenylenediamine (和光純藥工業株式會社) 及 100  $\mu$ l 3%  $H_2O_2$  之枸橼酸緩衝液 (citrate buffer) (pH 4.7)〕，經在室溫於暗室中感作 20 分鐘後每洞加入 50  $\mu$ l 3 N  $H_2SO_4$  中止酵素作用。然後以 ELISA 判讀機 (Microplat Reader, MR 600, Dynatech 公司) 在 490 nm 之波長判讀每個洞之 OD 值，供試血清之 OD 值如大於或等於陰性血清之平均 OD 值的 3 倍值則判定為陽性。(圖 1)

## 結 果

### 1. 乳羊之副結核病抗體調查：

調查台北縣乳羊 58 頭之副結核病補體結合抗體，結果有 19 頭之血清有抗補體現象無法判讀，其餘 39 頭均為陽性。

### 2. 牛副結核病抗體之初步篩選試驗 (screen test)：

由雲林、苗栗、屏東、台中、高雄、台南 6 個縣市之牛血清中抽取 361 頭測定其補體結合 (CF) 抗體，結果有 18 頭之血清有抗補體現象無法判讀，其餘 343 頭中有 162 頭 (47.23%) 為 CF 抗體陽性，詳如表 1 所示。

### 2. 補體結合試驗及酵素結合免疫吸附法 (ELISA) 應用於牛副結核病之血清學診斷之比較：

表 1 牛副結核病抗體之初步篩選試驗：

地 區	調查頭數	CF 抗體陽性數	抗補體數	陽性率*, %
雲 林	112	55	1	49.55
苗 栗	20	10	6	71.43
屏 東	20	19	1	100
台 中	20	14	2	77.78
高 雄	170	48	8	29.63
台 南	59	16	0	27.12
合計 6	361	162	18	47.23

\* 陽性率 = CF 抗體陽性數 / (調查頭數 - 抗補體數)  $\times$  100%

較：

由前述之篩選試驗血清中抽取 143 個 CF 抗體陽性血清，9 個 CF 抗體陰性血清及所有 18 個抗補體血清再進行 ELISA 測試，其結果如表 2 所示，在 18 個抗補體血清中有 2 個為 ELISA 抗體陽性，CF 抗體陰性血清以 ELISA 法測試亦皆為陰性，但 CF 陽性血清中有 129 個為 ELISA 陰性，只有 14 個亦為 ELISA 陽性。

如將抗補體個數併入 CF 抗體陰性頭數後與 ELISA 法所得之結果，進行 Mc Nemar 氏考驗，其公式和演算結果為：

$$x^2 = \frac{(n_{12} - n_{21})^2}{n_{12} + n_{21}} = \frac{(2 - 12p)^2}{2 + 12p} = 123.12$$

所得之卡方值極大，無論採  $\alpha = 0.05$ , 0.01 甚至 0.005 ( $\alpha =$  level of significance, 顯著水準) 均有極顯著差異，亦即

表 2 CF 試驗及 ELISA 試驗應用於牛副結核病之診斷之比較

ELISA 法	C F 法		抗補體	
	陽 性	陰 性		
陽 性	14	0	2	16
陰 性	129	9	16	154
合 計	143	9	18	170

表 3 以 ELISA 法調查本省牛副結核病感染情形：

地 區	調查頭數	陽性頭數	陽性率, %
苗 栗	200	11	5.50
台 中	100	3	3.00
台 南	200	3	1.50
高 雄	200	2	1.00
花 蓮	100	7	7.00
桃 園	100	5	5.00
彰 化	100	4	4.00
台 北	3	0	0
合 計 8	1,003	35	3.48

ELISA 法之特異性較 CF 法之特異性顯著為高。

#### 4. 牛副結核病抗體調查：

以 ELISA 法調查台灣牛隻感染副結核病情形，共調查採自苗栗等 8 個縣市之 1,003 頭牛血清，結果呈 ELISA 抗體陽性反應者 35 頭，陽性率為 3.48%，詳如表 3 所示。

### 討 論

有關副結核病之血清學診斷方法曾有補體結合試驗、螢光抗體法、免疫擴散法、免疫電泳法、被動血球凝集試驗 (passive-hemagglutination test) 等方法被發展出來，其中以補體結合試驗最被廣泛使用，但是上述之方法特異性皆很差，常會有偽陽性反應出現，尤其是在曾感染其他抗酸菌或 *Corynebacteria*，*nocardia* 及 *rhodococcus* 等細菌之動物。<sup>(1,2,7)</sup> 因此近年來 Yokomizo 等人<sup>(6)</sup> 發展以副結核菌體之原生質內抗原進行之酵素結合免疫吸附法 (ELISA 法) 測定副結核病抗體，結果發現 ELISA 之結果與由糞便分離副結核菌之一致性頗佳並較免疫擴散法為敏感，稍後又發展以 *Mycobacterium phlei* 吸附處理牛血清的方法使非特異性反應顯著減低，<sup>(7)</sup> 本試驗仿 Yokomizo 等人之改良方法進行 ELISA 試驗並與補體結合試驗之成績比較，結果顯示 ELISA 法之特異性極為顯著的較 CF 法為高，並且不會有由於血清中存在之抗補體成分等情形而干擾其結果之判讀。另據 Yokomizo<sup>(1)</sup> 之報告在 150 頭副結核菌排菌牛中 CF 抗體陽性率僅為 26%，而 ELISA 抗體陽性率則達 74%，顯示 ELISA 之敏感性亦較 CF 法為佳，因此 ELISA 法可能是目前最適合適用於副結核病診斷的血清學方法。

本調查以 ELISA 法調查 8 個縣市之 1003 頭牛，結果發現有 7 個縣市之 35 頭 (3.48%) 牛具有副結核病抗體，因而顯示本省不僅已有副結核病之污染並且其分布已十分廣泛，雖然目前尚未有病例報告亦未分離到副結核菌，但對本病之防治亦已不容忽視。

### 誌 謝

本試驗承蒙日本農林水產省家畜衛生試驗場，生物活性研究室室長橫溝祐一博士之技術指導及提供試材得以完成，謹致謝忱。

### 參考文獻

1. 橫溝祐一。1985。牛のヨーネ病について。日獸會誌，38：489-495。
2. Julian, R. J. 1975. A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. Jour.*, 16:33-43.
3. Merkal, R. S. K. E. Kopecky, A. B. Larsen and J. R. Thurston. 1964. Improvements in the primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. Jour. Vet. Res.*, 25:1290.
4. Merkal, R. S. and A. B. Larsen. 1962. Improved methods for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. Jour. Vet. Res.*, 23:1307.
5. Yokomizo, Y., T. Hiramune and Y. Isayama. 1970. Antibodies produced in a cow naturally infected with Johne's disease. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, 10:137-142.
6. Yokomizo, Y., R. S. Merkal and P. A. S. Lyle. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. Jour. Vet. Res.*, 44:2205-2207.
7. Yokomizo, Y., H. Yugi and R. S. Merkal. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47: 111-119.

A SEROLOGICAL SURVEY ON MYCOBACTERIUM  
PARATUBERCULOSIS INFECTION IN TAIWAN

Y. S. Lu, H. J. Tsai, M. J. Kwang, S. Y. Lai, Y. L. Lee,  
D. F. Lin and C. Lee

Th Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect specific antibodies against Mycobacterium paratuberculosis in bovine serum pre-absorbed with M. Phlei. The result indicated that the ELISA was significantly more specific than the complement fixation

(CF) test ( $p < 0.005$ ).

A total of 1,003 sera of cow were collected from 8 counties in Taiwan in 1985. Antibodies against M. paratuberculosis were found in 35 sera (3.48%) from 7 counties by the ELISA.