

硫氫乙醇(Mercaptoethanol)凝集試驗應用於 牛布氏桿菌之血清學診斷

吳義興 葉明穎 楊揚輝

台灣省家畜衛生試驗所

應用硫氫乙醇(Mercaptoethanol)凝集試驗(Mercaptoethanol tube agglutination test, MTA)測定172頭乳牛血清，並與標準試管凝集(tube agglutination test, TA)及補體結合試驗(Complement fixation test, CF)比較，結果MTA試驗若以1:10或以上為陽性，CF試驗以1:5或以上為陽性，則其相對敏感性及特異性均達99%以上。反觀TA試驗，不管以1:10、1:20或1:40為陽性界限均會使其相對特異性或敏感性降低到不能單獨應用之程度。但MTA試驗時產生之異臭亦限制其無法作廣泛之應用。

關鍵字：牛，布氏桿菌病，硫氫乙醇凝集試驗

牛布氏桿菌病是一種人畜共同傳染病，因此世界各國均列為牛之主要傳染病，積極作各種定期檢查及撲殺。在本省，乳牛布氏菌桿病每年亦作二次之定期檢查，首先在各地方家畜疾病防治所，以筆者所研製之玫瑰苯平板凝集抗原作初步之篩選(1)，可疑陽性血清再送到淡水台灣省家畜衛生試驗所作標準試管凝集試驗及補體結合試驗。由於凝集試驗所測之血清抗體以IgM為主要部份，此類抗體常有非特異性之存在，故一般血清學診斷時均以補體結合試驗之結果作為最後綜合判定之依據，標準試管凝集反應為副(2)。但血清樣品有時因抗補體之存在而無法以補體結合試驗作測定，此時則需用其他試驗方式以協助判定。硫氫乙醇(Mercaptoethanol)可切斷IgM之雙硫鍵使之不會產生凝集反應(6)。一般非特異性或小牛免疫19號疫苗之凝集抗體，大部份為IgM，若以硫氫乙醇凝集試驗測其力價，則較之普通試管凝集試驗呈顯著下降(4)。但若為感染陽性血清，因其仍有IgG凝集素之存在，故其力價不降或僅略下降(5)，由此可鑑別凝集反應之

特異性。但此種下降之程度及判定之標準則需廣泛之測試及檢討，並與其他二種血清學試驗相比較。

試驗材料與方法

硫氫乙醇凝集試驗用抗原：以日本家畜衛生試驗場出品之標準試管凝集用抗原，高速離心，去上液，再以生理鹽水洗3次，其沈澱物以生理鹽水再懸成最初之濃度，以國際標準陽性血清，測其力價後供用。

硫氫乙醇凝集試驗(MTA)：試驗方法依Alton等(2)所述之方法進行，血清以含0.1M硫氫乙醇之生理鹽水稀釋後，分別加入上述製備之抗原，放37℃一夜後判定。測定之血清同時測定標準試管凝集試驗及補體結合試驗。

標準試管凝集試驗(TA)：抗原使用日本家畜衛生試驗場出品之試管凝集用抗原，一般稀釋1:10後使用，其操作方式依Alton等(2)之方法進行。

補體結合試驗(CF)：抗原使用日本家畜衛生試驗場出品之流產布氏桿菌脂多醣抗原，稀釋1:100後使用，溶血素使用Difco公司出品之含甘油溶血素。

補體：以 10 頭天竺鼠抽血，分離血清，混合後分裝凍結並測定力價後供用。補體結合試驗之操作方法則依 Alton 等(2)所述 Hill 氏之方式進行。

試驗結果

以生理鹽水洗後之菌液，與標準陽性血清同時作 2 進位系列稀釋後作棋盤式力價測定，其結果與洗滌前並無顯著之差異，亦以稀釋 1

: 10 之液，可使 2 單位之布氏桿菌陽性血清產生 50% 之凝集。以下之硫氫乙醇試管凝集試驗將使用此種抗原及濃度。

自布氏桿菌病污染牧場採集 172 個血清樣品，經如前述之 MTA、TA 及 CF 之操作方式分別測定其血清力價，結果如表 1。在 CF 試驗力價 $\geq 1:20$ 之 21 頭血清中，MTA 試驗力價與 TA 試驗力價頗相符合，在 21 頭中僅有 2 頭血清 MTA 試驗力價較 TA 試驗力價下

表 1 血清樣品分別以硫氫乙醇凝集試驗 (MTA)、標準試管凝集試驗 (TA) 及補體結合試驗 (CF) 測定之結果

CF test 力價	血清數	TA Test				MTA Test			
		<1:10	1:10	1:20	$\geq 1:40$	<1:10	1:10	1:20	$\geq 1:40$
<1:5	138	100	30	8	0	137	0	1	0
1:5	6	0	4	2	0	0	6	0	0
1:10	7	0	1	5	1	0	1	6	0
$\geq 1:20$	21	0	0	0	21	0	0	0	21
合計	172	100	35	15	22	137	7	7	21

降一格稀釋倍。但在 CF 試驗力價 $< 1:5$ 之 138 頭血清中，有 37 頭血清 MTA 試驗力價均顯著較 TA 力價為低。CF 試驗力價為 1:10 之 7 頭血清有 1 頭 TA 力價為 1:10，但 MTA 試驗亦呈陽性之 1:10。

若依現行牛奶布氏桿菌病檢驗標準，CF 試驗力價 $\geq 1:5$ 為陽性，MTA 試驗力價若訂 $\geq 1:10$ 為陽性則試驗結果之相對敏感性及特异性分別為 100% 及 99.28%，如表 2。

表 2 硫氫乙醇試驗對補體結合試驗之相對敏感性及特异性

MTA Test	CF Test		合計	相對敏感性：100%
	+	-		
+	34	1	35	相對特异性：99.28%
-	0	137	137	
合計	34	138	172	

a：硫氫乙醇試驗以 ($\geq 1:10$) 為陽性，補體結合試驗則以 ($\geq 1:5$) 為陽性。

標準試管凝集試驗若以 $\geq 1:40$ 為陽性，雖其相對特異性可達100%，但其敏感性則僅有64.7% (22/34)。若TA試驗以 $\geq 1:20$ 為陽性，則其相對敏感性及特異性分別為

85.29%及94.20%，如表3。敏感性仍未能達到理想。若TA試驗陽性界限再降，以 $\geq 1:10$ 為陽性，則其相對敏感性可提高到100%，但相對特異性却下降為72.64%，如表4。

表3 標準試管凝集試驗以 $\geq 1:20$ 為陽性對補體結合試驗之敏感性及特異性

TA Test	CF test		合 計	相對敏感性 85.29 %
	+	-		
+	29	8	37	相對特異性：94.20 %
-	5	130	135	
合 計	34	138	172	

表4 標準試管凝集試驗以 $\geq 1:10$ 為陽性對補體結合試驗之敏感性及特異性

TA Test	CF test		合 計	相對敏感性：100 %
	+	-		
+	34	38	72	相對特異性：72.64 %
-	0	100	100	
合 計	34	138	172	

討 論

Mylrea 等報告(5)補體結合試驗力價 $\geq 1:16$ 之血清，其凝集試驗力價很穩定，不受硫氫乙醇處理之影響，因其抗體大部為 IgG。而補體結合試驗力價 $\geq 1:4$ 之血清，其凝集力價以硫氫乙醇處理則大致均會消失。在本試驗之結果(表1)亦證明此點，補體結合試驗力價 $\geq 1:20$ 之21頭血清中，僅有2頭其MTA力價較其TA力價下降一格稀釋倍數。而在CF試驗力價 $< 1:5$ 之血清138頭中僅有一頭血清在MTA試驗力價未下降者。若MTA試驗以 $1:10$ 或以上之力價為陽性，

CF試驗則依現行乳牛布氏桿菌病檢驗標準 $\geq 1:5$ 為陽性，則其相對敏感性及特異性均達99%以上，確實是一種很符合CF試驗之檢驗方法。此在英國，Nicoletti(6)亦有相似之報告。反觀TA試驗，其陽性標準不管訂在 $1:40$ 或 $1:20$ 或 $1:10$ 均有其缺點，前二者特異性高，但敏感性低，分別為64.7%及85.29%，此會使得很多陽性牛檢查不出，變成潛伏之感染源。後者則其相對敏感性提高，但其相對特異性亦隨之下降到72.46%，此結果造成很多偽陽性，使得血清以此法檢查後必需再進一步以CF試驗測定一次。但因其敏感性高不致遺漏帶原者之存在，故目前全省奶牛血清在

筆者試驗室中之檢查亦採用試管凝集 $\geq 1:10$ 者，全部再測定 CF 試驗。此為本省乳牛布氏桿菌病能迅速控制而降到 0.07 % 以下的因之一。

在本試驗中仍有發現 MTA 試驗力價達 $1:20$ 而 CF 試驗力價 $< 1:5$ 者，此可能某些個體其抗體含大量之 IgG₂，此種免疫蛋白雖會產生凝集反應但與補體却不能結合(3)，故 MTA 試驗之力價較 CF 試驗力價為高。

在豬之布氏桿菌病血清學檢查，由於豬血清中含大量之抗補體物質，因此 CF 試驗常無法進行，由於 MTA 試驗在牛布氏桿菌病之檢查上，幾乎與 CF 試驗相符合，此種方法值得試用於豬布氏桿菌病之血清學檢查。

硫氫乙醇凝集試驗應用於乳牛布氏桿菌病之血清學診斷，其對補體結合試驗之相對敏感性及特異性均達 99% 以上，值得採用於有抗補體存在之血清。MTA 試驗之唯一缺點是硫氫乙醇之臭味常引起實驗室其他工作人員之不快，但若試驗過程均在抽氣櫃中進行則可避免之。

參考文獻

1. 吳義興，謝快樂，呂清泉。1980。玫瑰苯抗原之研製及應用於本省牛隻布氏桿菌病之診斷。台灣省家畜衛生試驗所報告。
2. Alton G.G., L.M. Jones and D.E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in Brucellosis. 2nd ed. who, Geneva.
3. Allan G.S., R.J. Chappel, P. Williamson and D.J. McNaught 1976. A quantitative comparison of the sensitivity of serological test for bovine Brucellosis to different antibody classes. J. Hyg. Camb. 76:287-298.
4. Morgan M.J.B. 1967. The serological diagnosis of bovine Brucellosis Vet. Rec. 80: 612-621.
5. Mylrea P.J. and G.C. Fraser. 1976. The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine Brucellosis. Aust. Vet. J. 52:261-266
6. Nicoletti P. 1969. Further evaluation of serological test procedure used to diagnose Brucellosis. AJVR. 30:1811-1816.

**Evaluation of Mercaptoethanol tube agglutination test for
serological diagnosis of bovine Brucellosis**

Yi Shing Wu, M.Y. Yeh and Y.H. Yang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

SUMMARY

The mercaptoethanol tube agglutination test (MTA) was used in diagnosis of bovine Brucellosis. The results of the test on 172 samplet were compared to those detected by standard tube agglutination(TA) test and complement fixation (CF) test.

When taking the titers of MTA test higher than 1:10 and CF test titer higher than 1:5 as positive response, the relative sensitivity and specificity of MTA test were above 99%. When the positive titer was taken at 1:40, 1:20 or 1:10 in TA test, the relative sensitivity or specificity to CF test was low. The result shows that TA test alone could not be used in diagnosis. However the disagreeable smell of mercaptoethanol limited the routine application of MTA test.

Key word. Bovine, Brucellosis, mercaptoethanol agglutination test