

應用酵素標示免疫吸附法 (ELISA) 測定本省牛布氏桿菌病血清抗體

吳 義 興

台灣省家畜衛生試驗所

應用酵素標示免疫吸附法測定牛布氏桿菌病血清抗體。使用 96 孔平底微量盤，抗原使用菌體抽出之脂多醣 (LPS) 較全菌體為佳，抗原以 PH 9.6 之碳酸緩衝液稀釋為 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ，每孔放 0.1 ml 在 4°C 一夜結合最適當。阻蓋液使用凝膠液效果最佳。被测血清稀釋 1:100 再予測定，其陽性界限 OD 值為 0.40。

應用 ELISA 法測定 22 頭經補體結合試驗及試管凝集試驗測定結果為陽性之牛血清，其結果亦均陽性，其測定之力價與該二種試驗者之相關係數分別為 0.927 及 0.943。

牛布氏桿菌病血清抗體之測定方法很多，有平板急速凝集試驗。卡式試驗 (Card test)，⁽³⁾ 玫瑰苯抗原試驗 (Rose Bengel test)，⁽⁴⁾ 標準試管凝集試驗，⁽⁵⁾ 及 Rivanol 沈降試驗等，⁽⁶⁾ 此些試驗均利用抗原與抗體作用後再產生第 2 次級反應而凝集，依此凝集程度而測定另外目前最廣泛應用於牛布氏桿菌病之血清學診斷且被認為最敏感而可靠的試驗是補體結合試驗，⁽⁷⁾ 此法亦是利用抗體結合抗原後，第 2 次反應而結合補體，產生反應，此法在血清含抗補體時則無法使用，抗體力價太高時會有阻礙區 (Prozone) 反應之出現抑制正常之反應。由於第 2 次級反應常僅血清中部份特異球蛋白可產生反應，故敏感性及特異性均有其限制，無法單獨正確地應用作為診斷，因此在血清學診斷時，必需二種或數種試驗同時併用。

第一次反應方式以測定牛布氏桿菌病血清抗體之方法有放射線免疫試驗 (Radio.im-

muno assay)⁽⁸⁾ 及酵素標示免疫吸附法 (enzyme linked immuno-sorbent assay, ELISA)，^(9,10,11) 但前法除昂貴之放射性元素標示藥品及偵測設備限制其廣泛應用外，放射性元素之危險性使它之實用性更減低。酵素標示免疫吸附法敏感性及特異性均很高，它不但用於血清學診斷，近年來更進一步應用於抗原之分析上。近來由於使用 96 孔平盤及判讀機，ELISA 之測定已可客觀正確而迅速測定出，臨床應用之價值大力提高，本試驗將測定應用 ELISA 時之標準條件及其應用於本省牛布氏桿菌病之血清學檢查與其他檢查方法之比較。

試驗材料及方法

抗原：

全菌抗原使用流產布氏桿菌 (Brucella abortus) 1 型，125 號株，菌體懸液之濃度為 $1.4 \times 10^{11} / \text{ml}$ 。流產布氏桿菌脂多醣 (

LPS, Lipopolysaccharide) 抗原, 仍由本菌以熱水—熱石炭酸抽出者,⁽⁴⁾ 其濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。⁽⁸⁾

免疫血清:

流產布氏桿菌標準陽性血清為自布氏桿菌病陽性牛所採, 並經國際標準血清同定其力價。陰性血清則為連續 5 年均無發生本病之牧場牛血清。測定用血清樣品則為全國牛布氏桿菌病污染牧場之血清。

標示抗體:

冷凍乾燥兔抗牛 IgG 標示過氧酶 (horseradish peroxidase) 美國 Numic 公司產品先以 1 ml 蒸餾水溶解後, 再以含 0.25% 牛血清白蛋白之磷酸緩衝液 (pH 7.2) 稀釋 10 倍後, 分裝每瓶 0.5 ml, 保存於零下 80°C 冰箱中備用。

基質液:

鄰位二酚胺 (OPD, OrthoPhenylendiamine) 以甲醇溶成 1% 液存於零下 35°C 暗處中, 使用時, 以磷酸鹽—檸檬酸鹽緩衝液 (pH 5.0) 10 ml 加入 OPD 4mg 及 H_2O_2 0.01%。⁽¹²⁾

阻蓋液:

1% 之牛血清白蛋白於磷酸緩衝液中。另以不同品牌之凝膠 (gelatin) 依莊之方法⁽²⁾, gelatin 2.5g (0.25%), 0.15M NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Tween 20 及 5mM 之 Tris (base) 泡製成凝膠 NET 阻蓋液。

酵素標示免疫吸附法之操作步驟:

使用 96 孔平底微量塑膠盤, 抗原以碳酸鹽緩衝液 (pH 9.6) 加 0.01M 之 EDTA (CBB-EDTA) 稀釋後, 每孔加 0.1 ml 覆被, 放 4°C 一夜, 隔天倒棄抗原液後以磷酸緩衝液 (pH 7.2) 含 0.05% Tween 20 (PBS-Tween) 洗一次後, 加入阻蓋液各 0.2 ml, 放 37°C 1 小時, 以阻蓋非特異結合位置。倒去上液後再以 PBS-Tween 洗 3 次, 加入以 PBS-Tween 稀釋 100 倍之血清樣品或標準血清 0.1 ml, 放 37°C 1 小時, 取出倒去上液後, 以 PBS-Tween 洗 3 次。加入適當稀釋之標示抗體 0.1 ml, 再放 37

°C 1 小時, 倒棄上液後以 PBS-Tween 洗 3 次, 每孔加入基質液各 0.1 ml, 放 37°C 30 分鐘後以判讀機 (Titertac 310 C Flow 公司) 使用波長 492 nm 判讀測定。反應停止每孔加入 1M H_2SO_4 0.1 ml。

補體結合試驗

抗原使用日本家畜衛生試驗場出品之補體結合試驗抗原, 其脂多醣 (LPS) 含量約每 ml 100 μg , 使用時再稀釋 100 倍後使用。試驗步驟依 Alton 等⁽³⁾ 所載 Hill 氏之改良法, 血清稀釋後各取 0.2 ml 放入試管, 再加入等量之抗原, 混合後再放入含 5 單位之補體液 0.2 ml, 混合後放 4°C 冰箱中, 隔天早晨再加入 0.4 ml 之敏感綿羊血球液, 混合後放在 37°C 水浴 30 分鐘, 放置每隔 10 分鐘取出搖動混合, 30 分鐘即第 3 次混合後判定, 依其溶血程度若 50% 以上溶血即判定為陽性。使用之敏感紅血球液亦在使用前一天準備, 綿羊紅血球洗 3 次後懸成 3% 液, 再加入等量含 2 單位之溶血素 (Difco 出品) 混合後放冰箱中, 可 10 天內使用。

試管凝集試驗

抗原使用日本家畜衛生試驗場出品之牛流產布氏桿菌病試管凝集用抗原, 含菌量約 4% (V/V), 使用時稀釋 10 倍後與稀釋血清等量混合, 放 37°C 溫箱中一夜後判定, 詳細操作步驟均依 Alton 等⁽³⁾ 所述之步驟及判定方式進行, 凝集呈 50% 以上時判定為陽性。

試驗結果

酵素標示免疫吸附試驗之標準化:

1. 脂多醣 (LPS) 抗原與全菌抗原之比較: 脂多醣抗原及全菌抗原以 CBB-EDTA 作 2 倍稀釋由 1:50 到 1:3200, 而血清則使用標準陽性血清及陰性血清, 以 PBS-Tween 分別稀釋 1:100, 另以 PBS-Tween 替代血清作為無血清對照。酵素標示抗體則稀釋 1:500 後使用。ELISA 之操作步驟如前述。測定結果如圖 1。以脂多醣 (LPS) 為抗原, 其陽性血清測定之平均吸光度 (OD, Optic density) 較之全菌為抗原而測定者為高。但在陰性血清及無

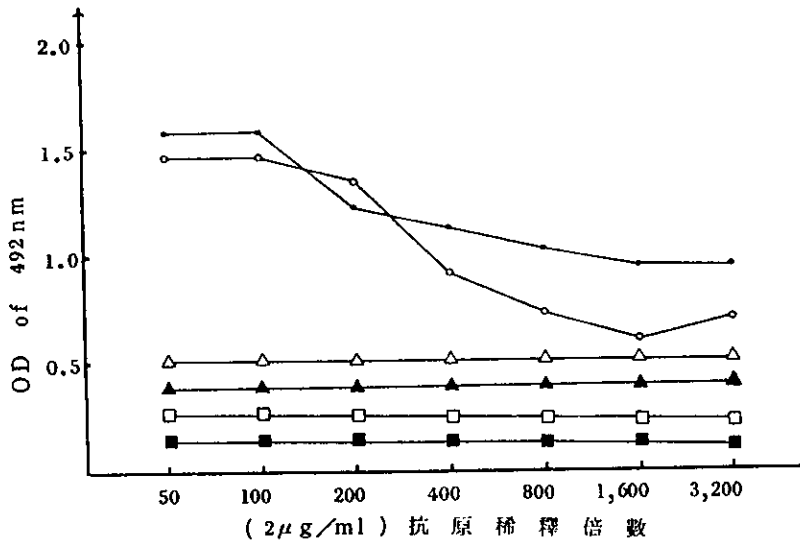


圖1
流產布氏桿菌脂多醣抗原及全菌抗原之比較。
陽性血清 (●, ○), 陰性血清 (▲, △) 及 PBS-Tween 對照 (■, □)。

圖2
不同酸鹼度緩衝液對抗原覆被之影響。脂多醣抗原以 PH 9.6 之 CBB (●陽性血清, ○陰性血清), PH 7.2 之 PBS (▲, △), 及 PH 5.0 之枸橼酸緩衝液 (■, □) 稀釋後測定之結果。

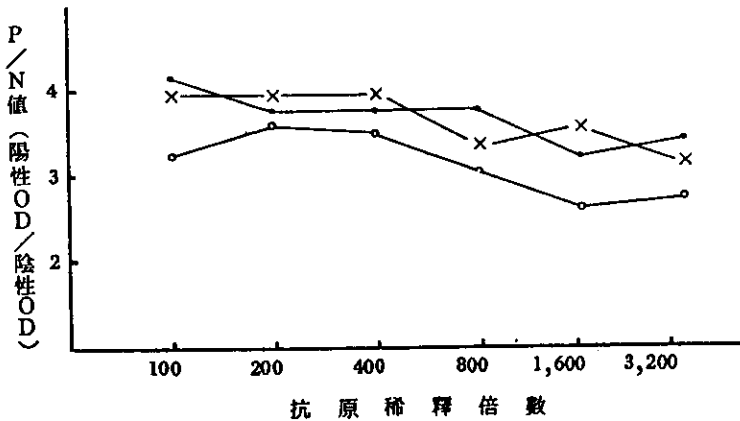
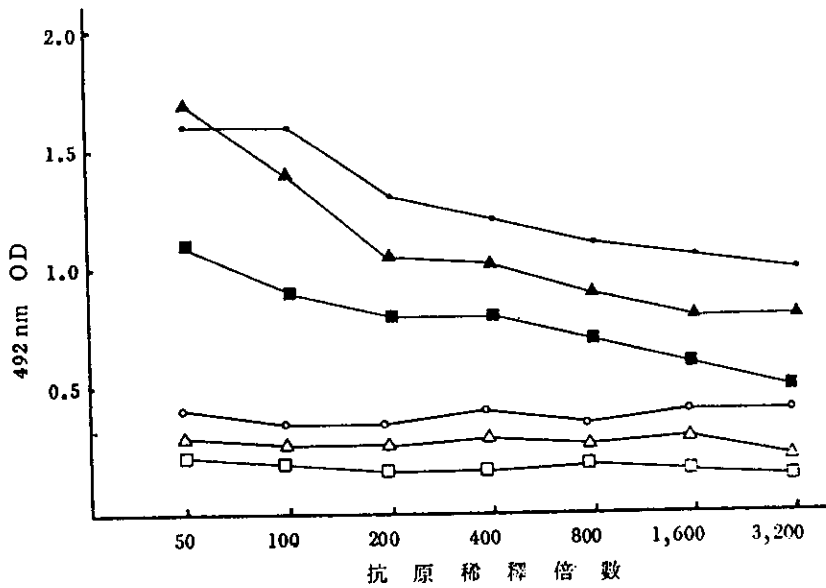


圖3
不同被覆溫度比較之結果。25 °C 1小時 (○-○), 37 °C 1小時 (×-×) 及 4 °C 一夜 (●-●)。

血清之對照上則全菌為抗原者其平均 OD 值反而略高於脂多醣為抗原者。

2. 抗原覆被條件之測定。脂多醣抗原分別以 0.05 M 碳酸鹽緩衝液 (PH9.6) 加 0.01 M EDTA (CBB-EDTA), 0.1 M 磷酸緩衝液 (PH 7.2) 加 0.01 M EDTA (PBS-EDTA) 及 0.075 M 枸橼酸緩衝液 (CPB) (PH5.0) 作 2 倍稀釋, 由 1:50 到 1:3200, 稀釋後分別於 96 孔平板各加 0.1 ml 後, 放 4 °C 覆被一夜, 隔天再洗, 阻蓋及加稀釋 1:100 之陽性及陰性血清, 再以稀釋 1:500 之酵素標示抗體如前述之步驟測定之。其結果如圖 2。抗原以 CBB-EDTA 稀釋後作測定結果最理想, 其陽性血清可得最高之 OD 值而陰性血清之值雖略高於其他二種稀釋緩衝液, 但並無顯著之差異。抗原覆被之溫度, 以放在 4 °C 一夜, 25 °C 1 小時及 37 °C 1 小時三種, 脂多醣抗原以 CBB-EDTA, 稀釋自 1:100 到 1:3200, 陽性血清及陰性血清之 OD 值扣去不加血清之空白 OD 值後, 二者相除所得之 P/N 值結果如圖 3, 以 4 °C 一夜與 37 °C 1 小時並無顯著性之差異, 但 25 °C 1 小時則其 P/N 值則較前二者為差。
3. 最適宜抗原濃度之測定: 脂多醣抗原以 CBB

-EDTA 稀釋 1:50 (2 μg/ml), 1:100 (1 μg/ml), 1:200 (0.5 μg/ml) 及 1:400 (0.25 μg/ml) 後加入 96 孔微量平盤中, 放 4 °C 一夜被覆後, 依前述之步驟操作, 血清則以 PBS-Tween 稀釋, 自 1:100 到 1:3200, 分別加入, 以棋盤式方法測定各抗原濃度之 P/N 值 (陽性吸光度/陰性吸光度) 在此測定中標示抗體濃度使用 1:1000。測定結果如圖 4, 抗原之濃度以 1:100 即 1 μg/ml 者所得之 P/N 值最高, 濃度再增加則 P/N 值反而開始減低。

4. 標示抗體最適濃度之測定: 凍結乾燥之酵素標示抗體以 1 ml 蒸餾水溶解後, 再以 PBS (PH7.2) 稀釋自 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000 及 1:2500, 分別使用, 以測定最適宜之稀釋濃度。抗原使用脂多醣 1:100 (1 μg/ml) 每一平盤小孔放 0.1 ml, 置 4 °C 一夜, 再如前述洗後加阻蓋液再洗 3 次, 加入稀釋 100 倍之陽性及陰性血清, 於 37 °C 1 小時, 洗後再分別加不同濃度之標示抗體, 感後加基質測定結果如表 1。由 P/N 值看標示抗體以使用 2000 倍稀釋液最令人滿意, 雖然各種稀釋倍數間之差異並不顯著, 但若以 (P-N

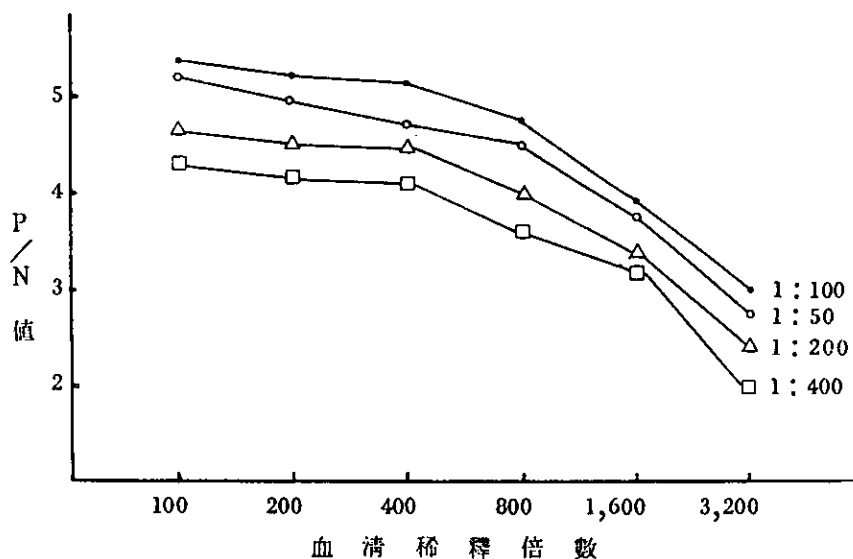


圖 4 抗原濃度測定。抗原稀釋 1:50 (2 μg, ○), 1:100 (1 μg, ●), 1:200 (0.5 μg, △) 及 1:400 (0.25 μg, □)。

表1 酵素標示抗體最適濃度測定

	各種標示抗體濃度之OD值				
	1:500	1:1,000	1:1,500	1:2,000	1:2,500
陽性血清 (P)	1.584	1.546	1.470	1.383	1.230
陰性血清 (N)	0.554	0.522	0.410	0.309	0.288
無血清PBS (B)	0.233	0.225	0.121	0.068	0.072
P-B/N-B	4.21	4.45	4.70	5.56	5.36
P-N/B	4.42	4.55	8.76	15.79	13.08

表2 各種阻蓋液之比較 (OD 值)

	1 %牛血清蛋白	Merck 牌凝膠	Sigma 牌凝膠
陽性血清 (P)	1.623	1.501	1.468
陰性血清 (N)	0.467	0.363	0.373
無加血清 (B)	0.144	0.076	0.096
P-B/N-B值	4.58	4.96	4.95
P-N/B值	8.02	14.97	11.41

) / B ((陽性血清 OD值 - 陰性血清 OD值) / 無血清空白之 OD值) 則稀釋 2000 倍之標示抗體則可顯著地較其他稀釋倍數為佳。

5. 阻蓋液之選擇：阻蓋液以 Merck 牌及 Sigma 牌之凝膠 NET 液依前述之泡法製備，另以 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 於 CBB-EDTA 液中作比較。操作方法如前述，抗原使用 1:100 (1 μ g/ml)，陽性及陰性血清稀釋 1:100 使用，標示抗體使用 1:1500。測定結果如表 2，雖然依 P/N 值看 3 者並無顯著之差異，但以 Merck 牌凝膠液最理想。若以 (P-N) / B (陽性血清 OD 值減去陰性血清 OD 值再除以空白無血清 OD 值) 則可更明顯看出 Merck 牌凝膠為阻蓋液可減少很多之非特异性結合。

總結以上，牛布氏桿菌病之酵素標示免疫吸附法 (ELISA) 之標準步驟仍使用 LPS 抗原以 CBB-EDTA 稀釋為每 ml 含 1 μ g 作為抗原液，抗原液在 4 $^{\circ}$ C 下覆被一夜，血清樣品以 PBS-Tween 液稀釋 1:100 後使用，加血清前之阻蓋液使用 Merck 牌之凝膠液，其製備法如上述。標示抗體稀釋 1:2000 使用。

特異性試驗：

連續 3 年無布氏桿菌病之牧場牛 180 頭之血清，先以試管凝集試驗測定力價均在 1:10 以下，補體結合試驗力價 1:5 以下，經以上述之 ELISA 標準步驟測定結果，其扣去空白值後之平均 OD 值為 0.211 \pm 0.05987 (\pm SD 標準偏差)，以平均值加 3 個標準偏差值得 0.389，故其陽性 OD 值界訂為扣去空白值

後大於 0.40 者為陽性。

另以 3 年無布氏桿菌病牧場之血清，但牛白血病陽性者 20 頭，流行熱陽性者 20 頭及結核病陽性皮內反應牛 15 頭，之血清以上述標準步驟測定結果其 OD 值均在 0.4 以下。

敏感性試驗：

以布氏桿菌病污染牧場 132 頭牛之血清分別以試管凝集試驗，補體結合試驗 (CF Test) 及酵素標示免疫吸附法 (ELISA) 予以測定，方法如前工作方法所述，試管凝集試驗最終稀釋倍數 1:40 是 50% 或以上之凝集時判定為陽性，稀釋 1:20 是 50% 以下之凝集者為陰性，介於二者之間為疑陽性。補體結合試驗測定之方法如前工作方法中所述，血清

稀釋 1:5 可 50% 或以上阻止溶血均判定為陽性。

132 頭牛血清先以試管凝集試驗測定結果 (表 3) 陽性 15 頭陰性 108 頭，疑陽性 9 頭，再以補體結合試驗測定結果表 3，陽性之 15 頭全部陽性，陰性 108 頭亦全部陰性，而疑陽性 9 頭中 7 頭 CF 試驗陽性，2 頭陰性，故 CF 試驗陽性共有 22 頭。以 100 稀釋血清後作 ELISA 法測定，其結果與 CF 試驗完全符合相對敏感性與特異性達 100%，以 ELISA 法測定之力價與試管凝集試驗和補體結合試驗測定之力價相關圖如表 5 及表 6，其相關係數分別為：

表 3 酵素標示免疫吸附法與其他試驗比較之相對敏感性及特異性

	補 體 結 合 試 驗			試 管 凝 集 試 驗			
	+	-	合計	+	±	-	合計
ELISA +	22	0	22	15	7	0	22
ELISA -	0	110	110	0	2	108	110
合 計	22	110	132	15	9	108	132
相對敏感性	100%			91.67%			
相對特異性	100%			100%			

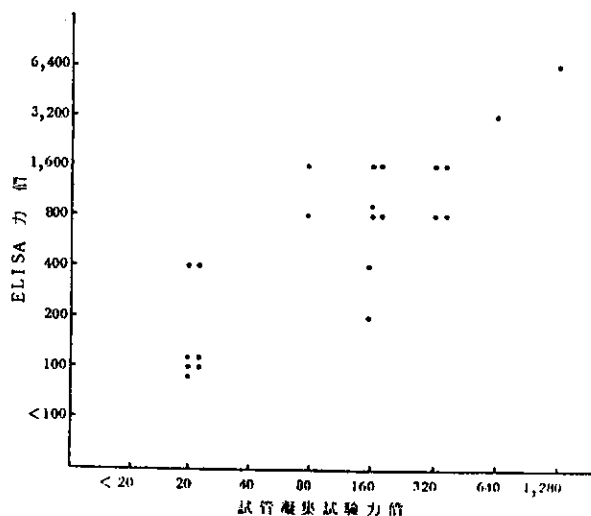
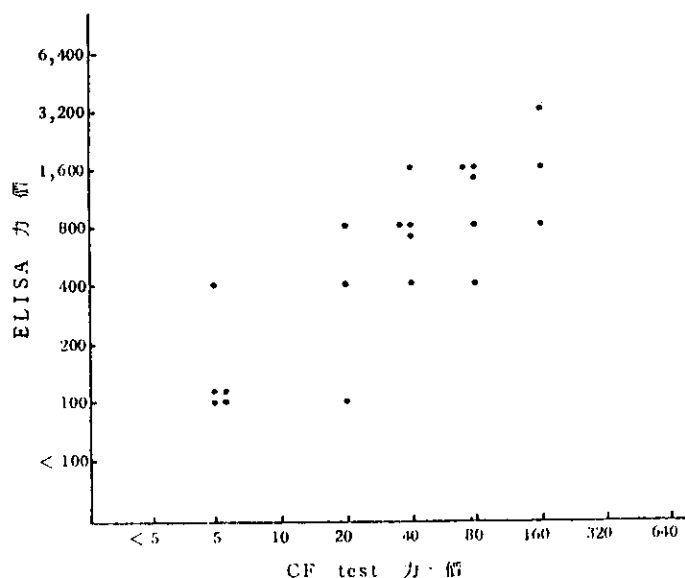


圖 5
試管凝集試驗力價與 ELISA 力價之相關 (n = 22, r = 0.943)

圖 6
補體結合試驗與ELISA 力
價之相關 ($n = 22$, $r =$
 0.927)



討 論

有關布氏桿菌病之酵素標示免疫吸附法 (ELISA) 測定用抗原, 大部份之報告均使用菌體抽出之可溶性脂多醣 (LPS) 抗原, (5,7,10) 但亦有人使用全菌抗原, (11) 為明瞭此二種抗原之差異, 在本試驗中, 把 LPS 抗原與全菌抗原作一比較, 結果發現全菌抗原在陽性血清稀釋 1:200 時尚很敏感, 其平均 OD 值與使用 LPS 抗原者不相上下 (圖 1), 但陽性血清稀釋超過 1:200 後, 其測得之 OD 值即急速下降, 顯示其在測低力價血清時敏感性不良。在陰性血清及不加血清之空白對照, 全菌抗原均產生較 LPS 抗原高之非特異性反應, 此會使平均陽性界限之 OD 值增大, 以致測定之敏感性亦隨之下降, 故認為布氏桿菌病之 ELISA 測定, 應使用 LPS 抗原較為適當。在抗原覆被之稀釋液方面, Nielsen 等 (9) 曾以不同 PH 之緩衝液結合測定盤再予沖洗而測定殘留之 LPS 抗原量, 結果認為以 PH 7.2 之 PBS 結合性最佳, 但在本試驗結果却以 PH 9.6 之碳酸鹽緩衝液 (CBB) 最佳, 此種差異可能在 LPS 濃度之不同, 在 LPS 濃度低時, CBB 之效果較 PBS 為佳, 此可由 Nielsen 等 (9) 測定時使用之濃度均在 15.6

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上, 及本試驗 (圖 2) 中看出, 在 LPS 抗原 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ (1:50) 時, PBS 所得平均 OD 值猶大於 CBB 者, 但 LPS 抗原再進一步稀釋時, 則以 PBS 稀釋者所得之 OD 值即急速下降而較 CBB 者為低, 由於在本試驗測得最佳之 LPS 抗原濃度為 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 故稀釋液仍採用 CBB (PH 9.6) 為佳。在阻蓋液方面, 一般之 ELISA 應用報告均使用 1% 之血清白蛋白, 但莊 (2) 報告牛血清白蛋白本身仍會有些微之非特異性結合標示抗體之作用, 此會影響使陰性血清及不加血清之空白對照產生較高之 OD 值, 本試驗經比較其與凝膠 NET 液作為阻蓋液之效果, 結果與莊 (2) 之報告相同 (表 2), 凝膠 NET 液為阻蓋液可明顯地減少非特異性之 OD 值而提高反應之 P/N (陽性/陰性) 值。

為使牛布氏桿菌病之 ELISA 測定法之非特異性反應減到最低, 本試驗把各步驟均予測定比較, 其結果牛布氏桿菌病之 ELISA 法最好使用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 之 LPS 抗原, 抗原以 PH 9.6 之 CBB 液稀釋後, 96 孔平盤每孔 0.1 ml, 加後放 4°C 一夜以覆被, 沖洗液使用 PH 7.2 之 PBS 加 0.05% Tween 20 (PBS-Tween), 阻蓋液使用 Merck 牌凝膠 NET 液最佳, 血清樣品亦以 PBS-Tween

液稀釋 1 : 100 後使用。標示抗體使用 1 : 2,000 稀釋液，但此隨廠牌及其有效力價而異，基質液則 Voller⁽¹⁾ 之泡法使用鄰位二酚胺 (OPD)，加後 30 分鐘以波長 492 nm 測定。

本試驗以上述之標準方式測定 180 頭布氏桿菌病連續 3 年陰性牛群，得其陽性界限 OD 值為 0.400 初步測定本省布氏桿菌病污染牧場被判定為陽性之 22 頭牛血清，ELISA 法結果亦均陽性，陰性之 110 頭牛血清，測定結果亦均陰性 (表 3)，其敏感性及特異性 100% 符合目前之判定標準，顯示本法應用於臨床血清學之診斷上價值極高，值得進一步擴大測定及評估其應用之可行性。

參考文獻

1. 吳義興、謝快樂、呂清泉。1980。玫瑰苯抗原之試製及應用於本省牛布氏桿菌病之診斷。台灣省家衛試所報告。16 : 1-4。
2. 莊榮輝。1985。水稻蔗糖合成酶之研究：生物化學及免疫學之研究。台大農化系博士論文。
3. Alton, G. G., L. M. Jones and D. E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in *Brucella abortus*. 2nd ed. Geneva, WHO.
4. Berman, D. T., B. L. Wilson, E. Moreno, R. O. Angus and L. M. Jones. 1980. Characterization of *Brucella abortus* soluble antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol. 11: 355-362.
5. Byrd, J. W., F. C. Heck and R. T. Hidalgo. 1979. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Brucella abortus* antibodies. AJVR. 40:896-898.
6. Chappel, R. J., P. Williamson, D. J. McNaught, M. J. Dalling and G. S. Allan. 1976. Radioimmunoassay for antibodies against *Brucella abortus*: A new serological test for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb. 77:369-376.
7. Heck, F. C., J. Pruett, R. Sanders and D. L. Zink. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. AJVR. 41: 2082-2084.
8. Janda, J. and E. Work. 1971. A colorimetric estimation of lipopolysaccharide. FEBS Lett. 16:343-345.
9. Nielsen, K., J. Stiller, G. Adams and R. Williams. 1983. Binding of *Brucella abortus* whole cell and lipopolysaccharide antigen to plastics. Research in Vet. Sci. 34:131-137.
10. Stemborn, B. W., K. H. Nielsen, B. S. Samagh, L. B. Forbes and D. G. Ingram. 1980. Evaluation of an enzyme-labeled antiglobulin test for anti *Brucella* immunoglobulin G among 3 cattle populations. AJVR. 41:1779-1784.
11. Thoen, C. O., M. P. Hopkins, A. L. Armbrust, R. D. Angus and D. E. Pietz. 1980. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in sera of *Brucella suis* - infected swine. Can. J. Comp. Med. 44:294-298.
12. Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gueinsey, England.

ELISA FOR DETECTING ANTIBODIES TO *BRUCELLA ABORTUS* IN BOVINE SERUM

Yi-Shing Wu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect antibodies to *Brucella abortus* in bovine serum. The assay was standardized in terms of antigen coating condition, optimal antigen concentration, serum and conjugate dilutions. The most optimal conditions for antigen coating was that LPS antigen was diluted to 1 μ g/ml with carbonate buffer (pH 9.6) followed by coating at 4°C overnight with 0.1 ml of

diluted antigen. The gelatin NET solution was most effective in blocking. The negative cutoff point was set at 0.40 while serum sample was diluted to 1:100.

The relative sensitivity and specificity of ELISA to both results of complement fixation test and tube agglutination test were 100% in 22 diagnostic positive sera. The correlation coefficients of ELISA to these two tests were 0.927 and 0.943.