

## 台灣牛隻麥可菌(微漿體)症之研究：

### II、血清學診斷法之探討

蘇杰夫<sup>1</sup> 劉敏主<sup>1</sup> 陳忠松<sup>1</sup> 彭衍初<sup>1</sup> 林本欽<sup>2</sup> 劉正義<sup>3</sup>

選取台灣分離之 *Mycoplasma bovirhinis*、*M. dispar*、*M. sp.*, group 7 及 *Acholeplasma laidlawii* 等麥可菌屬 (*Mycoplasmatales*) 菌株製成補體結合 (Complement-fixation; CF)，間接血球凝集 (Indirect hemagglutination; IHA) 及寒天沉降 (Ager gel precipitation; AGP) 等血清反應抗原，經與各類血清反應，顯示出抗原抗體反應特异性甚佳。

為探討及評價製成之血清反應抗原的效果而應用於野外牛隻抗體之測定，結果顯示 IHA 測得抗體依次為 *M. bovirhinis* 27.3% (29/106)，*A. laidlawii* 19.8% (21/106)，*M. sp. group 7* 16.9% (18/106) 及 *M. dispar* 11.3% (12/106)；CF 測得，*M. bovirhinis* 20.7% (22/106)，*A. laidlawii* 18.8% (20/106)，*M. sp. group 7* 11.3% (12/106) 及 *M. dispar* 8.4% (9/106)；但 AGP 僅測得 4.7% (5/106) *M. bovirhinis* 及 1.8% (2/106) *M. dispar*；證實本症之診斷上以 IHA 及 CF 較俱高敏感度且以前者較俱實用性。

*Mycoplasmatales* 對牛群所造成之病害及經濟損失，已被養牛事業先進國所確認<sup>(6-8)</sup>，筆者等<sup>(2)</sup> (1982) 曾就台灣 13 地區之酪農戶及畜牧場採取 2~6 月齡左右，外觀上健康或患有慢性呼吸器病之仔牛鼻腔分泌液，患有類似牛傳染性角膜結膜炎及乳房炎等檢體或病例中分離出 *M. sp. group 7*，*M. dispar*，*A. laidlawii* 及其他的 *mycoplasma spp.*，證實台灣牛群已遭 *Mycoplasmatales* 之侵襲。關於本症之診斷，如僅藉病原體之分離，非但費時且困難，若能尋出簡易準確之血清學診斷法，將有助於本病之診斷。且可行疫情調查以為本症防疫措施之依據。爰進行本項試驗。

### 材料與方法

#### 一、供試菌株及培地：

1. 菌株：*M. bovirhinis*、*M. dispar*、*M. sp.*, group 7 及 *A. laidlawii* 等台灣分離株及由 Dr. Ern  $\phi$  所提供之標準株。

2. 培地：以 Hanks' 緩衝液、PPLO broth (Difco) 等為基礎液再加入仔牛、馬血清，新鮮酵母抽出液，葡萄糖之 Hayflick 及 GS (Glucose-serum) 等培地。

#### 二、高度免疫血清之製備：

將上述之菌株於其所適應之培養液中經增殖培養後，以 9,000 rpm 高速遠心洗滌集菌，把菌株濃縮為原量之 1/100，加入等量之 Freund's complete adjuvant (Difco) 經超音波處理，使之乳化製成免疫用抗原，3 公斤左右之健康家兔經抗原多次刺激免疫注射后，放血分離血清，即為高度免疫血清，分裝置放 -20°C 保存，供為研製之診斷用抗原力價測定用。

#### 三、血清學診斷用抗原之製備：

1. 補體結合抗原：將各菌株依其所適應培地，經增殖培養 3~7 日後，加入 0.03% 之 Formalin

使之不活化，再經高速遠心洗滌集菌，濃縮原量之 1/50 ~ 1/100，再經磨碎機將聚集之菌體磨碎分散成懸浮液後，加入等量含 10 ~ 20 % 天竺鼠血清（即補體）Veromal 緩衝生理鹽水液，經振盪混合，置 4 ~ 10°C 冷室一夜後，再經 56°C 30 分鐘之非動化，即成補體結合抗原，加入少量 Thimerosal（Sigma）防腐劑，置於 4 ~ 10°C 保存備用。

2. 間接血球凝集抗原：依 Cho 氏等<sup>(3)</sup>（1976）方法，將濃縮菌體 2 份（其濃度約為 10mg/ml）與經 0.2% Glutaraldehyde PBG（phosphate buffered glucose）固定之 20% 綿羊血球 5 份於 37°C，16 ~ 18 小時之感作，使之結合，再以 PH7.0 之 0.01M PBS 遠心洗滌，最後配成 20% 之血球抗原液與 50% Glycerine PBS 混合，並加入 0.1% 之 sodium azid，置於 4 ~ 10°C 保存備用。

3. 寒天內沈降抗原：仿 Estola & Schulman<sup>(4)</sup>（1966）、Ross & Karman<sup>(11)</sup>（1970）等，將收集之菌體 1g 中加入 1% Sodium desoxycholate 0.05M PH8.5 PBS 液 100ml，置於室溫攪拌一夜，翌日以 0.1N 塩酸液調整 PH 至 7.5 然後加入 1ml 之 DNase（Sigma，1mg/ml）液，室溫 80 分鐘感作，再經 18,000 rpm 30 分鐘遠心取上清液，經 48 小時，4 ~ 10°C，6 回換液之透析後，再以 polyethylglycoly 濃縮成原量之 1/500，即得沈降抗原，置 -70°C 保存備用。

四 血清學診斷法術式與各抗血清交叉試驗：

依 Slavik & Switzer<sup>(12)</sup>（1972）、Cho 氏等<sup>(3)</sup>（1976）、Estola & Schulman（1966）及筆者<sup>(1)</sup>（1981）之微量反應法，將上述製成之 CF、IHA 及 AGP 抗原與各菌株之家兔免疫血清實施交叉反應試驗，以探討其敏感度及特異性。

五 野外血清之採集，抗體測定及麥可菌種分離：

由桃園縣及台中市轄內之乳牛畜牧場及仔公牛肥育場採取 3 ~ 6 月齡小牛之血清，經非動化及非特異性物質之處理（即受檢血清經同量之 5% 綿羊血球液作用，遠心之上清液，為 2 倍血清液）後，經與上述各類抗原行血清反應，藉以瞭解試製抗原對野外牛群反應之實際效果，同時由鼻腔採得分泌液以分離麥可菌種，究明血清反應與菌種感染間之關係。

## 結 果

一 試製血清學診斷用抗原與各菌株之家兔抗血清交叉試驗：

1. 補體結合反應試驗：

製成之各菌株補體結合抗原與原菌株抗血清測定力價後，再經配製成 4 單位抗原液，與經稀釋成 2 ~ 4096 稀釋列之各菌株家兔抗血清反應，結果如表 1 所示，僅同類（Homologous）抗原抗體間呈較高度之反應，而異類（Heterologous）間，雖多少有低度之反應，但仍顯示出製成之各抗原俱有高度之特異性。

2. 間接血球凝集反應試驗：

製成之各菌株間接血球凝集抗原，經 PH7.0 PBS 遠心洗滌三次後，配成 2% 間接血球凝集抗原液，與等量經 1% 健康家兔血清 PBS 稀釋之家兔抗血清混合後，靜置室溫 1 ~ 2 小時感作，判定其結果，如表 2 所示，仍僅同類抗原抗體間反應較異類高出很多，顯示其特異性。

3. 寒天內沈降反應試驗：

依微量法，將試製各菌株沈降抗原於 Agarose 製成之寒天孔穴內反應，結果在同類抗原抗體間呈現明顯之沈降線，而異類則否，其特異性較上述兩法為高，但不如該二法敏感，如表 3 所示。



## 三試製牛Mycoplasmatales 血清學診斷抗原對野外牛群之抗體測定：

由桃園縣及台中市轄內乳牛畜牧及仔公牛肥育場共採得 106 例之血清及鼻腔分泌液，經與牛隻之 *M. bovirhinis*、*M. dispar*、*M. sp.*, group 7 及 *A. laidlawii* 等菌株製成之 IHA、CF 及 AGP 抗原反應，病原體分離，結果測得之抗體，顯示台灣牛群確已有上述 mycoplasmatales 之污染，如表 4 所示，*M. bovirhinis* 及 *M. dispar* 等菌種之分離例須 IHA 與 CF 有較高之抗體（ $IHA \geq 128$ ， $CF \geq 16$ ）始可出現，但 *M. sp.*, group 7 及 *A. laidlawii* 之分離成績未必與抗體高低呈絕對關係；又 AGP 陽性反應例皆可分離出該抗原相對菌種。

表 4 野外牛群Mycoplasmatales 血清反應及麥可菌種分離間之關係

縣市別	檢體數	反應抗原及分離菌種	檢出麥可菌例	血清學反應（陽性例）				AGP
				IHA		CF		
				$\leq 64$	$\geq 128$	$\leq 4$	$\geq 16$	
桃園縣	46	<i>M. bovirhinis</i>	10	1	12	10	2	
		<i>A. laidlawii</i>	7	6	2	5	2	
		<i>M. sp.</i> , group 7	4	5	1	5		
		<i>M. dispar</i>	3		4		4	1
台中市	60	<i>M. bovirhinis</i>	12	4	12	1	11	3
		<i>A. laidlawii</i>	8	12	1	13		
		<i>M. sp.</i> , group 7	8	10	2	6	1	
		<i>M. dispar</i>	4	1	7	1	4	

## 討 論

有關 Mycoplasmatales 血清學診斷法有多種，何者較俱準確實用有待究明必要，鑑於此，筆者等選取台灣牛群出現頻率較高之菌種，試以製成血清學診斷用抗原，經試驗結果，各種抗原與高度免疫血清之作用，於同屬間所呈現反應較異屬為高，雖異屬間也呈低價反應，筆者等認為此可能為本菌目經增殖培養時之代謝物或培地中含有血清蛋白質變性，致遠心集菌時隨菌體之沉澱夾入免疫抗原中，使免疫家兔產生共同而非特異性之抗體，因此異屬間呈現輕微之反應。

本次試製之 CF 抗原，於未經天竺鼠血清處理時，存有抗補體現象，此種存在因子，尤以 *M. sp.*, group 7 及 *A. laidlawii* 較 *M. bovirhinis* 及 *M. dispar* 為高，筆者等發現，前兩菌種之發育速率較後兩者快，若以相等時間培養后再行集菌時，前者由於過度發育，因而產生之代謝物也較多，致抗補體因子隨之增加，故集菌之時機對於抗原中存有之非特異性因子多寡有密切關係，筆者等認為於各菌種發育至最高峯時儘快集菌，將可使這些非特異性因子減低；至於其棄除，據 Takatori 等<sup>(13)</sup>（1968）曾用 Ether、Trypsin 及 100°C 加熱，Hodges & Betts<sup>(9)</sup>（1969）之以 60°C 加溫與 Slavik & Switzer<sup>(12)</sup>（1972）以 56°C、30 分鐘等法處理，試把 *M. hyopneumoniae* 之 CF 抗原中存有的抗補體因子棄除，但筆者等此次以天竺鼠血清處理之效果很好，大都可除去上述抗原之抗補體。

Goodwin 等<sup>(5)</sup>（1969）、Lam & Swizer<sup>(10)</sup>（1971）等將抗原結合用之血球以 Tannic acid 處理製成 IHA 抗原，但該等抗原經不起長久之保存，其安定性不佳；Cho 等<sup>(9)</sup>（1976）改以 Glutaraldehyde 固定綿羊血球再與 *M. agalactiae* subsp. *bovis* 及 *M. bovirhinis* 等菌體結合製成 IHA 抗原，本次仿其法製成之 *M. bovirhinis*、*M. dispar*、*M. sp.*, group 7 及 *A.*

laidlawii 等 IHA 抗原，結果特異性高，安定且經 6 個月以上之保存仍不失其抗原性。

Taylor-Robinson 等<sup>(14)</sup> (1963) 曾將 *M. pneumoniae* 菌體經 10Kc 超音波處理；Estola & Schulman<sup>(4)</sup> (1966) 及 Ross & Karman<sup>(11)</sup> (1970) 等把 *M. hyosynoviae*、*M. hyorhinis*、*A. granularum* 及 *A. laidlawii* 等菌株之菌體經 DOC 抽取成份製成 AGP 抗原，證實其特異性相當高，本次依後者方法試製之抗原，對各原有菌株之家兔免疫血清皆俱有很好之特異性。

就試製之各類抗原對桃園縣及台中市轄內牧場之野外牛群之實例測驗，由血清反應及麥可菌種分離間之關係，顯示試製之血清反應抗原，俱有高度之特異性，但以 IHA 與 CF 之敏感度較高，雖 CF、IHA 及 AGP 間之反應結果稍有不同之結果，筆者等認為此或許是所持之免疫球蛋白類別不同所致。依上述結果，若為供地方上本症之疫情調查，似以 IHA 法較俱迅速簡單實用。

### 參 考 文 獻

1. 蘇杰夫。1981。台灣に於ける豚マイコプラズマ性肺炎に関する研究。日本麻布大學獸醫學博士學位論文，P 45～77。
2. 蘇杰夫、陳素貞、廖述吉、鄭建盛、傅祖慧、劉正義、林本欽。1982。台灣牛隻麥可菌（黴漿體）症之研究：I. *Mycoplasmatales* 之分離鑑定。中華民國獸醫學會雜誌。8：87～96。
3. Cho, H. J., H. L. Ruhnke and E. V. Langford. 1976. The indirect hemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with *Mycoplasmas*. *Can. J. Comp. Med.* 40: 20-29.
4. Estola, T. and A. Schulman. 1966. Isolation of SEP agent from pigs with enzootic pneumonia in Finland. *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 113-123.
5. Goodwin, R. F. W., R. G. Hodgson, P. Whittlestone and R. L. Woodhams. 1969. Immunity in experimentally induced enzootic pneumonia of pigs. *J. Hyg.* 67: 193-203.
6. Gourlay, R. N. and C. J. Howard. 1979. Bovine mycoplasmas. in "The mycoplasmas" edited by Tully, T. G. and Whitcomb, R. E. Academic Press, New York, London, 49-102.
7. Harbourne, J. F., D. Hunter and R. H. Leach. 1965. The isolation of mycoplasma from bovine lungs and nasal swabs. *Res. Vet. Sci.* 6: 178-188.
8. Hjerpe, C. A. and H. D. Knight, 1972. Polyarthrititis and synovitis associated with mycoplasma bovimastitis in feedlot cattle. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 160: 1414-1418.
9. Hodges, R. T. and A. O. Betts. 1969. Complement-fixation test in the diagnosis of enzootic pneumonia of pigs. I. Experimental studies. *Vet. Res.* 85: 452-456.
10. Lam, K. M. and W. P. Switzer. 1971. Mycoplasmal pneumonia of swine: Development of an indirect hemagglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 32: 1731-1736.
11. Ross, R. F. and J. A. Karmon. 1970. Heterogeneity among strains of *M. granularum* and identification of *M. hyosynoviae* sp. N. *J. of Bact.* 103: 707-713.
12. Slavik, M. F. and W. P. Switzer. 1972. Development of a microtitration complement-fixation test for diagnosis of mycoplasmal swine pneumonia. *Iowa state J. Res.* 47: 117-128.

13. Takatori, I., R. G. Huhn and W. P. Switzer. 1968. Demonstration of complement-fixation antibody against *M. hyopneumoniae* in the sera of pigs infected with swine enzootic pneumonia. Nat. Inst. An. Hlth. Qtr. 8 : 195-203.
14. Taylor-Robinson, D., H. C. Somerson and N. Chanock. 1963. Serological relationships and among human mycoplasmas as shown by complement-fixation and gel diffusion J. Bact. 85 : 1261-1273.

## STUDIES ON BOVINE MYCOPLASMOSIS IN TAIWAN

### II. EVALUATION OF PREPARED ANTIGENS ON SERODIAGNOSIS

Jei-Fu Su,<sup>1</sup> Ming-Chu Liu,<sup>1</sup> Chung-Sung Chen,<sup>1</sup> Yean-Chu Perng,<sup>1</sup>  
Pan-Chin Lin,<sup>2</sup> and Cheng-I Liu<sup>3</sup>

Antigens of complement-fixation (CF), indirect hemagglutination (IHA), and agar gel precipitation (AGP) were prepared from *Mycoplasma bovirhinis*, *M. dispar*, *M. sp. group 7* and *Acholeplasma laidlawii* isolated in Taiwan. The reaction of these antigens to the corresponding serum were high-specific.

Titration of antibodies against *Mycoplasma* spp. with these prepared antigens were made from the farm cattle. The positive rates of antibodies among the tested methods were shown as: IHA-*M. bovirhinis* 27.3% (29/106), *A. laidlawii* 19.8% (21/106), *M. sp. group 7* 16.9% (18/106) and *M. dispar* 11.3% (12/106); CF-*M. bovirhinis* 20.7% (22/106); *A. laidlawii* 18.8% (20/106), *M. sp. group 7* 11.3% (12/106) and *M. dispar* 8.4% (9/106); and AGP-*M. bovirhinis* 4.7% (5/106) and *M. dispar* 1.8% (2/106).

This study indicated that IHA and CF tests were more sensitive than AGP, and IHA was the best in practice.

---

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.  
2. Council of Agriculture, Executive Yuan.  
3. Department of Veterinary Medicine, National Chungshien University.