

布氏桿菌病乳環試驗抗原之試製及應用

吳義興 楊揚輝 李新進

以牛流產布氏桿菌99號株、125號株及1119—3號株分別試製成之乳環試驗用抗原，應用於牛乳汁之檢查，並與標準環抗原相比較之結果，其反應成績均無顯著性差異。

試製之抗原應用於乳牛布氏桿菌病之診斷，其對補驗結合反應之相對敏感度性及特異性分別為75.0%及90.6%。故乳環試驗雖然簡便但仍不適用於個別牛隻布氏桿菌病之篩選試驗，僅能作為牛羣是否污染布氏桿菌病之監視測定試驗。

緒 言

牛布氏桿菌病是乳牛最重要之人畜共同傳染病，它不但會使孕牛流產造成畜產之損失，而且由於它會感染人類引起波狀熱而成爲嚴重的公共衛生問題。布氏桿菌另一特徵是它可寄生於細胞內，故牛隻一旦感染後即不易由體內排除乾淨，可能終生寄生成爲永久之感染源，因此對牛氏桿菌病之撲滅必需使用各種血清學診斷方法，找出陽性反應牛而予以淘汰或撲殺。本省亦使用此種方法，經多年之努力，本省牛布氏桿菌病陽性率已低到0.25%以下，事實上僅剩數個污染牧場而已。

牛感染布氏桿菌後，乳液中常會有脂肪球蛋白之凝集素，此種凝集素若遇到布氏桿菌抗原，則會與之結合並附在脂肪球蛋白上浮到乳液上端，此時若把布氏桿菌抗原以各種色素如蘇木素或 Tertazolium 染等色後使用，則會在乳液上端形成一色素環，而乳液本身則仍呈白色或很淡之色^(3,5)。若無此種特異凝集素之存在，則染色抗原存於乳液中而乳酪層仍然爲白色。

此種乳環試驗只需採集少量之乳液則可作測定，不但簡便更由於不必爲採血及牛隻固定而驚擾牛隻影響乳產，故即使每月甚至每週檢查一次，亦很容易爲畜主所接受。適此本省牛布氏桿菌病進入清除之階段，茲試製乳環試驗用抗原，並在野外應用與其他血清學方法作比較。

材料及方法

抗原製造用菌株：臺灣省家畜衛生試驗所保存之牛流產布氏桿菌99號株，125號株及1119—3號株，以 Tryptic soy Agar 繼代保存。

染色液之配製：依世界衛生組織（WHO）之方法⁽³⁾，以 100ml 之10%硫酸銨鋁加甘油32ml，19%蘇木素（Hematoxylin）酒精溶液 100ml 及10%碘酸鈉 2ml，混合後放置室溫30分鐘，待染色液變成深紫色後再加入10%硫酸銨鋁 900ml，混合後濾，並以 1N HCl 調 PH 到3.1，保存於 4°C 備用。

洗菌液：0.4%氯化鈉液 1,600ml 加乳酸 1.5ml，10% NaOH 4.4ml，並調 PH 爲4.0。

乳環抗原之製造：依據世界衛生組織（WHO）之方法⁽²⁾，以馬鈴薯浸漬培養之菌液，經石碳酸鹽水洗數次後，置於 95°C 之水浴中處理 1 小時殺死，以 9,000rpm 離心30分鐘，沈澱之菌體每1gm 加 22.3ml 之染色液，在室溫中攪拌48小時，離心再以洗菌液洗數次，最後一次離心之沈澱菌體每

1gm 加 27ml 之石碳酸生理鹽水 (以 0.1M 之 citric acid 及 0.5M Na_2HPO_4 調 PH 為 4.0) , 再攪拌混合並調 PH 為 4.0—4.3 , 存於 4°C 備用。

乳環抗原之標準化：依世界衛生組織 (WHO) 之方法⁽³⁾ , 以虎克管 (Hopkin tube) 調整菌液濃度為 4% , 菌液兩稀釋 10 倍後作一系列稀釋 , 調節其濃度使其與國際標準血清 (1000 單位) 之 500 倍稀釋液可產生 50% 之凝集。

不同菌株乳環抗原應用之比較：國際標準血清以標準乳環抗原測定之陰性乳作一系列稀釋由 1 / 40、1 / 60……1 / 180 , 各取 1ml 於試管 , 如此作 4 列 , 各添加各株之乳環抗原 1 滴 , 第 4 列則使用德國製乳環抗原 (德國 Robert von Ostertag 研究所第 80—8 批) 各 1 滴 , 各試管混合後放 37°C 1 小時後判定比較之。另野外乳品以此三種自製乳環抗原及德國製乳環抗原作檢查 , 以比較其差異。

乳環抗原使用之方法及判定標準 , 乳液採集後放 4°C 20—48 小時 , 再取出輕輕上下搖動 , 取出 1ml 放於試管 , 添加乳環抗原 1 滴 , 再倒轉數次以混合 , 放 37°C 1 小時後判定 , 判定之標準如表 1。

表 1 乳環凝集反應判定標準

乳	液	層	乳	酪	層	判	定
深	藍	色	白		色	—	
深	藍	色	淡	藍	色	±	
藍		色	藍		色	+	
淡	藍	色	深	藍	色	++	
白		色	深	藍	色	+++	

乳環反應之檢查與其他血清學檢查之比較：乳環抗原檢查乳品 , 該牛並抽血以各種血清學試驗如玫瑰苯平板試驗 , 試管凝集試驗及補體結合試驗等作檢查 , 以比較及評估乳環試驗之相對敏感性 , 相對特異性及作卡方分析。

乳環反應與乳房炎之關係：測得之乳環反應陽性乳再與乳液檢查⁽⁶⁾ 及臨床乳房炎等作相關性統計。

試驗結果

以流產布氏桿菌 1119—3 號株、99 號株及 125 號株分別製成之乳環試驗用抗原與以陰性乳液稀釋之國際標準血清作乳環測定 , 並以德國製乳環抗原為對照 , 經測定結果如表 2 , 4 種抗原間並無顯著性之差異 , 但仍以 99 號株所製之抗原 , 其反應與德國製抗原之反應最接近 , 125 號株之抗原反應最強

表 2 各菌株製成之乳環抗原與德國製乳環抗原之比較

抗原種類	國際血清以陰性乳稀釋後之反應							
	×40	×60	×80	×100	×120	×140	×160	×180
1119—3 號株抗原	+++	+++	+++	+++	+	—	—	—
99 號株抗原	+++	+++	+++	+++	++	±	—	—
125 號株抗原	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—
德國製抗原	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—

，而1119—3號株之抗原反應較弱。4種乳環抗原同時應用於200頭牛乳品以檢查其反應，結果均相同，但形成之乳環色以自製者較深藍色。由於99號抗原與德國製標準品較為接近，故以下之試驗均採用此。

以乳環抗原檢查牛布氏桿菌病污染及非污染牧場之乳牛共974頭，各頭牛並採血作玫瑰荖平板凝集試驗，試管凝集試驗及補體結合試驗，其結果如表3。乳環試驗以乳酪層之色液層深者即“+++”以上為陽性，結果在974頭牛中有102頭呈陽性反應，16頭補體結合反應陽性牛却只檢出12頭，檢出之敏感性僅有75%。為了解乳環反應臨床上之應用價值，以補體結合試驗之結果為標準，比較乳環試驗、玫瑰荖平板凝集試驗及試管凝集試驗的相對敏感度，相對特異性及卡方分析值，其結果如表4。

表3 乳環試驗與血清平板及試管凝集試驗檢查之結查

檢 驗 方 法		MR			RB			TA		
		+	-	合 計	+	-	合 計	+	-	合 計
CF	+	12	4	16	15	1	16	15	1	16
	-	90	868	958	7	951	958	5	953	958
合 計		102	872	974	22	952	974	20	954	974

MR：乳環試驗。RB：玫瑰荖平板試驗。TA：試管凝集試驗。CF：補體結合試驗。

表4 以補體結合反應為基準比較乳環試驗與其他血清試驗

試 驗 法	相 對 敏 感 性 (%)	相 對 特 異 性 (%)	卡 方 值 χ^2
MRT	75.00	90.60	72.24
RBT	93.75	99.27	616.78
TA	93.75	99.48	680.08

MRT：乳環試驗。RBT：玫瑰荖平板凝集試驗。TA：試管凝集試驗。
 χ^2 卡方值：依Mc Nemar 氏法計算⁽¹⁾。

乳液以加利福尼亞乳房炎試驗 (CMT) 測定，陽性67頭中乳環反應陽性有15頭，而此15頭中13頭是臨床乳房炎，如表5，92.9% (13/14) 之臨床乳房炎會使乳環試驗呈陽性，而 CMT 陰性乳均不會使乳環反應產生陽性。潛伏性乳房炎僅少數 5.2% (2/38) 會使乳環產生陽性反應。如表5所列。

表5 乳房炎與乳環反應之關係

乳 房 情 况	CMT 試 驗		臨 床 乳 房 炎		潛 伏 性 乳 房 炎		
	+	-	+	-	-	+	
MRT* {	+	15	0	13	2	2	0
	-	52	220	1	271	36	235
合 計	67	220	14	273	38	23	

註 MRT：乳環試驗。CMT：加利福尼亞乳房炎試驗⁽²⁾。

討 論

布氏桿菌病乳環試驗是一種很簡便而迅速的診斷篩選方法，因此被廣泛應用於非污染本病之牧場。由於本省牛布氏桿菌病已逐漸減少，此種試驗用之抗原必將試製，其應用時之各種性質亦必需了解。本試驗以世界各國現使用之牛流產布氏桿菌三種標準株—99 號株、125號株及1119—3 號株分別試製成之抗原與德國製標準抗原作比較，結果三種抗原均很令人滿意，並無顯著性之差異，但仍以99號株之成品與標準抗原最為相接近。在乳液中形成之乳環色澤方面，試製品所成之乳環色較標準品略深，乳環色澤之差異可能是製造過程使用藥品量之差異所致，因自製品依 WHO 之方法製造⁽³⁾，而標準品則依英國 Weybridge 中心研究所之方法⁽⁵⁾製，而此二種方法雖然藥品及製造過程相同，但劑量上則略有差異。

乳環試驗檢查乳牛之布氏桿菌病，若以個別乳牛之乳液作一次測定，則其與現行作為標準之血清補體結合反應之相對敏感性僅有75%，而同時以玫瑰苯抗原⁽²⁾測定血清則其相對敏感性在93.75%，故乳環試驗以檢查一次個體乳液事實無法作為乳牛布氏桿菌篩選或監視之用⁽⁴⁾。Roepke 等^(6,7)亦報告此僅有65%之相對敏感性，但他們以整個牧場之混合乳作檢查時，則95%之污染牛羣均可檢查出來，故建議乳環試驗交給牧場或集乳站工作人員自行作每日之檢查，若有陽性反應時，則再採血以玫瑰苯抗原篩選及作試管凝集試驗、補體結合試驗等一系列之鑑定診斷^(4,6,7)。

乳環試驗除初乳及乾乳期之乳液會引起假陽性反應外，牛有乳房炎時亦會引起假陽性反應，尤其是臨床乳房炎時，其92.9%會使乳液產生假陽性之乳環反應，少部分之潛伏性乳房炎亦會產生此種現象。故乳環試驗應與乳房炎檢查相配合進行，若乳環試驗陽性很多而血清檢查均為陰性，則該牛羣可能有臨床乳房炎之存在。另據著者實地之測試，布氏桿菌病引起之乳環試驗陽性時，四個分乳房均呈陽性，若為乳房炎引起之偽陽性，則常為其一個或數個分乳房呈陽性，而很少全部四個分乳房之乳均呈陽性者。

參考資料

1. 毛文乘。1979。非獨立樣本比例之卡方考驗：Mc Nemar 氏考驗。177—179。生物統計學第一版。環球書局。臺北。
2. 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。臺灣省家衛試所報告。16：1—4。
3. Alton G. G., Lois M. Jones and D. E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in Brucellosis. 2nd edition World Health Org., Geneva.
4. Janney G. C., d. T. berman and A. A. Erdmann. 1958. The relative efficiency of Themilk ring test and area blood tests for bovine brucellosis. J. A. V. M. A. 133, (Dec. 15, 1958), 586—589.
5. Morgan W. J. B., D. J. Mackinon, K. P. W. Gill, S. G. M. Gower and P. I. W. Norris. 1971. Standard laboratory techniques for diagnosis of Brucellosis. Central Vet. Lab. Weybridge, Surrey.
6. Roepke M. H, and F. C. Stiiies. 1970. Potential efficiency of milk ring test for detection of Brucellosis. Am. J. Vet. Res. 31, 2145—2149.
7. Roepke m. H., J. M. Patterson, and B. L. Deyoe. 1974. Brucella ring test sensitivity of individual and pooled bovine milks with various preservatives. Am. J. Vet. Res., 35, 115—118.
8. Schalm O. W. and D. O. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. AJVMA, 130, 199—204.

Preparation and application of Brucella milk ring test antigen

Y. S. Wu, Y. H. Yang and S. C. Lee

In this experiment, while compared with standard Brucella milk ring test antigen, Brucella milk ring test antigens prepared with Brucella abortus stain 99, 125, and 1119-3 indicated no significant difference in reactive effects.

In relative sensitivity and specificity of milk ring test were 75.0% and 90.6% while compared with the complement fixation test. The data show that the milk ring test was not suitable for Brucellosis screening test of individual cows but it would be applicable on herds.

