

# 玫瑰苯抗原之試製及應用於本省 牛布氏桿菌病之診斷

吳義興 謝快樂 呂清泉

試製玫瑰苯酸性平板凝集抗原 (RBA)，試用於本省乳牛布氏桿菌之血清學檢查，並與標準平板凝集試驗，血清試管凝集試驗及補體結合試驗相比較。500頭平板試驗陰性血清，RBA試驗均為陰性。29頭試管凝集試驗及補體結合試驗綜合判定為陽性血清，RBA試驗均為陽性。181頭平板試驗陽性而試管試驗陰性血清，RBA 僅有 4頭 (2.2%) 是陽性。18頭試管凝集試驗疑陽性而補體結合試驗陰性血清，RBA 試驗有 13頭 (89.4%) 是陽性。此證明玫瑰苯抗即敏及特異性均較現行製造之標準平板凝集抗原為佳並與試管凝集抗原成績相當，確為一種良好特異性甚高而可靠之牛布桿菌血清學檢查篩別試驗用抗原。

牛布氏桿菌病之血清學檢查方法甚多 (3)，日前在我國採用的方法分為初檢及複檢，初檢由家畜疾病防治所，應用標準平板凝集試驗，檢出為陽性牛血清者送到省家畜衛生試驗所，以血清試管凝集試驗複檢，其疑陽性及陽性血清進一步以補體結合試驗測定。經綜合判定為陽性牛予以撲殺，而疑陽性牛則間隔 2~3 個月再採血測定。

經數年來的統計，由地方以標準平板凝集反應測定為陽性之血清，經再測之綜合判定為陽性者，常只為其中之 20% 以下，標準平板試驗之過於敏感及特異性之偏低引起各方批評。此種原因仍標準平板凝集抗原在消除非特異性之能力上較差，因此很多國家均改用各種改良式之檢查方法，其中歐州國家使用之玫瑰苯抗原被認為最簡便而準確之方法 (7, 9)。本試驗仍依照英國 Weybridge 獸醫研究所之製造方法 (10) 試製玫瑰苯抗原，並應用此抗原與標準平板抗原、標準試管凝集抗原及補體結合抗原互相比較應用於本省牛布氏桿菌病之檢查。

## 材料及方法

抗原：臺灣省家畜衛生試驗所保存之 *Brucella abortus* 99號株，經選平滑菌落後再以 Tryptic soy agar (Difco) 大量增殖，經 72小時培養後以生理鹽水洗下菌體，放於 60°C 水浴不活化 1 小時，再添加 0.5% 之石炭酸，放於 4°C 備用。

1% 玫瑰苯染色液：玫瑰苯色素 (Rose Bengal dye, Merck牌) 10gm 加蒸餾水 990ml 溶解，放置 2 小時以上，過濾後使用。

BBA (Buffered *Brucella* antigen) 稀釋液：NaOH 21.1gm 以 0.5% 石炭酸鹽水溶解後，再加入乳酸 (lactic acid) 95ml 混合，再添加 0.5% 石炭酸鹽水到含量為 1056ml，測定其 pH 應為 3.65 ± 0.05。(用乳酸及氫氧化鈉調節)

玫瑰苯抗原之染色：把收集之不活化布氏桿菌抗原於 4°C 以 10,000rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液，依菌體重量每 1gm 加 22.5ml 之石炭酸鹽水，攪拌使之混懸，再依菌液量每 3.5ml 加上上述玫瑰苯染色液 1ml，再繼續攪拌 2 小時以上，以紗布過濾，濾液於 4°C 10,000rpm 離心 10 分鐘，去清液，沉澱染色菌體再稱重後，每 1gm 菌體加 BBA 稀釋液 7ml，攪拌混合後，存於 4°C 冰箱。

玫瑰苯抗原之標準化：*Brucella abortus* 國際標準血清 (每 ml 1,000 國際單位) 以 1ml 蒸餾水

( 2 )

溶解後，以石炭酸鹽水稀釋為1/30、1/35、1/37.5、1/40及1/42.5，每稀釋倍數血清取1滴各與1滴抗原在玻璃板上混合，並轉動4分鐘後判定，抗原應與1/30稀釋血清凝集，而1/40稀釋血清則不凝集，若不合此標準則調節抗原之濃度直到適合此標準為止。

牛血清及玫瑰苯抗原之使用方法：為1977年全省牛布氏桿菌病第2期調查，各縣市檢查標準平板試驗陽性血清228頭及任意抽檢500頭陰性血清。被檢血清1滴與1滴玫瑰苯抗原在玻璃板上混合，並轉動4~8分鐘後判定，若有凝集塊則為陽性。

補體結合試驗及試管凝集試驗：使用冷法補體結合試驗，其補體及溶血素為Difco製品，抗原為日本家畜衛生試驗場出品，其操作步驟如WHO(3)之方式。試管凝集試驗使用德製試管凝集抗原(Robert Von Ostertage Institute出品)，其操作方法亦如WHO之方式(3)，其判定標準則依本所獸醫實驗室法手冊(2)所定之標準作綜合判定如表1。

表 1. 布氏桿菌病血清試驗判定標準

試管凝集試驗	補體結合試驗	綜合判定
<1/20* (50IU)	<1/5**	陰性
1/20~1/40	~1/5	疑陽性
>1/40 (IU)	>1/5	陽性

\* 血清最終稀釋倍數 (完全凝集)

\*\* 血清稀釋倍數

## 結 果

500頭標準平板凝集試驗陰性血清以玫瑰苯抗原檢查結果均為陰性。

標準平板凝集試驗陽性血清228頭，經試驗如表2，試管凝集試驗陰性(1/20以下)者181頭，以玫瑰苯抗原檢查有177頭(97.8%)陰性。試管凝集試驗疑陽性以上(1/20以上)47頭，以玫瑰苯抗原檢查則有42頭(89.4%)為陽性。血清試管凝集陽性血清(1/40以上)29頭，以玫瑰苯抗原檢查結果全部為陽性，而其中25頭血清以補體結合試驗為陽性。玫瑰苯抗原檢出陽性牛血清抗體之正確率達89%以上。

表 2. 標準平板試驗陽性血清以試管凝集試驗補體結合試驗及玫瑰苯抗原檢查結果

血清個數	試管法 血清稀釋倍數	補體法			玫瑰苯法	
		-	+	ND*	-	+
181	1/20 (50IU) 以上			181	177	4
18	1/20~1/40	18	0		5	13
29	1/40 (100IU) 以上	4	25		0	29

\*ND: 沒有測定

## 討 論

酸性平板凝集抗原 (Acidified Plate Antigen) 應用於牛布氏桿菌病血清學檢查可消除非特異性 (1,8,14) 故它較之標準平板凝集抗原能更正確地診斷出牛布氏桿菌病陽性血清，為一種相當可靠之篩別試驗用抗原。玫瑰苯抗原與 Card test 用之抗原 (1,13) 相似，是一種以玫瑰苯染色之改良型酸性平板凝集抗原，它使應用者能更迅速而正確的作判定。玫瑰苯抗原為何及如何消除血清中之非特異性，迄今爭論甚多，但大部份研究者均認為由於此種抗原只作用於 IgG 血清蛋白，而與含非特異抗體之 IgM 之反應很弱 (4,5,6,12)。

此次試製之玫瑰苯抗原經試用於 500 頭標準平板凝集陰性血清及 25 頭試管法及補體法綜合判定陽性血清，結果成績完全一致。它應用於疑陽性之血清，與試管法相較亦有 89.4% 之相符合率，其結果與 Morgan 等 (7,9) 所報告者幾乎相同。在試管法陰性血清應用玫瑰苯抗原檢查則只有 2.2% 為假陽性，可見玫瑰苯抗原在消除非特異反應上頗有效果，足以代替目前本所製造之標準平板凝集抗原並可省略試管凝集試驗之操作，況且此種抗原價廉而且操作簡單迅速，施值得大力推廣於臨床上應用。

## 參 考 資 料

1. 楊子儒、黃建祥、詹益波及王炯辰。1963。牛布氏桿菌酸性抗原平板凝集反應之研究。臺灣省家畜衛生試驗所報告，1：66—71。
2. 臺灣省家畜衛生試驗所。1977。獸醫實驗室手冊。第 2 版。臺灣淡水。
3. Alton G. G., L. M. Jones, and D. E. Pietz. 1975. Laboratory techniques in Brucellosis. WHO. Geneva.
4. Corbel M. J. 1972. Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal test for bovine Brucellosis. J. Hyg. 70. 779—795.
5. Corbel M. J. 1973. Studies on the mechanism of the Rose Bengal plate test for bovine Brucellosis. Br. Vet. J. 29, 157—166.
6. Corbel M. J. 1973. Characterization of antibodies active in the Rose Bengal test. Vet. Rec. 90, 484—485.
7. Davies G. 1971. The Rose Bengal test. Vet. Rec. 88, 447—449.
8. Lambert G. and T. G. Amerault. 1962. An evaluation of acidified plate test antigens for detecting bovine Brucellosis. Am. J. Vet. Res. 23, 1031—1033.
9. Morgan W. J. B., D. J. MacKinnon, J. R. Lawson and G. A. Cullen. 1969. The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of Brucellosis. Vet. Rec. 85, 636—641.
10. Morgan W. J. B., D. J. MacKinnon, 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.
11. Nicolletti P. 1967. Utilization of the card test in Brucellosis eradication. JAVMA, 151, 1778—1783.
12. Patterson J. M., B. L. Deyoe and S. S. Stone. 1976. Identification of immunoglobulin associated with complement fixation agglutination and low PH buffered antigen tests for Brucellosis. Am J. Vet. Res. 37. 319—324.
13. Pietz D. E. and E. A. Schilf. 1968. A rapid Brucellosis card test using buffered Brucella antigen. J. Vet. Res. 29, 1—8.

14. Rose J. E. and M. H. Roepke. 1957. An acidified antigen for detection of nonspecific reaction in the plate agglutination test for bovine Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 18, 550—555.

## Preparation of Rose Bengal antigen and its application on diagnosis of bovine Brucellosis

Yishing S. Wu, Happy K. Shieh and. C. C. Lu.

Preparation and standardization of a Rose Bengal antigen (RBA). It is used on serologic test for diagnosis of bovine Brucellosis.

All 500 negative serum samples of standard plate agglutination (SPA) test, RBA test is negative. With 29 positive serum samples of serum agglutination tube (SAT) test or/and complement fixation (CF) test, the Rose Bengal test shows all positive too. In 181 serum samples with SPA test positive but SAT test negative, Rose Bengal antigen test has only 4 (2.2%) false positive. Among 18 samples with SPA test positive and SAT test inconclusive, RBA test has 13 (89.4%) samples positive. The data demonstrated the Rose Bengal antigen has higher sensitivity and specificity than SPA antigen.