

牛布氏桿菌病酸性抗原平板凝集

反應之研究

(1) 與補體結合反應之比較

楊子儒 高建祥 詹益波 王炯辰

臺灣省家畜衛生試驗所

臺灣 淡水

一 緒 論

1951年 Hess 與 Roepke 於牛布氏桿菌病平板凝集反應呈非特異反應之牛血清中，發現一非特異反應之因子；並以 Filter-paper Chromatographic Test 區別感染牛與非特異反應牛。Amarasinghe (1955) 則以 *Brucella abortus* 之粗糙型菌株 (9R Rough Antigen) 吸收非特異凝集素。1953年，Hoerlein 以 56°C 試管凝集反應法區別布氏桿菌病之非特異反應。

1957年，Rose 與 Roepke 等於研究布氏桿菌非特異凝集素之電氣動性而在各種 PH 之緩衝液中透析時，發現於 PH 4.0~5.0 之緩衝液透析者，時而有減低非特異凝集反應之現象。彼等以非特異性凝集素為易酸性 (Acid labile) 之假說之下，於多數低價特異性血清與非特異性血清中增量地加入 50% 醋酸。此時發現當 PH 在 4.25 以下時，非特異性血清之凝集價降呈陰性，但特異性血清則在 PH 3.8 至 4.25 之間亦不改變其凝集價或僅降低一稀釋階段而已。

該二者之凝集價在 PH 3.9 至 4.15 之間相差最為顯著。根據上述成績，彼等進而加醋酸或乳酸於平板凝集用抗原中以調節平板凝集反應中 25 倍血清，一抗原混合液之 PH 為 4.0，以便野外檢查之用。由多數個體所採之血清，因其緩衝性或酸結合能均相似，極少受酸性抗原之影響，故抗原及血清混合液之 PH 易調節為 3.9 至 4.1 之間，即阻止非特異凝集反應之適當 PH。

余等在檢查乳牛血清時常發現本省現行之凝集反應與補體結合反應之差異甚大，常感診斷困難。為除去平板凝集反應之非特異性並明瞭酸性凝集反應與補體結合反應之關係起見，曾按照 Rose 與 Roepke 之原理配製酸性抗原，以 Glass Electrode PH meter 測定 PH 後實施酸性凝集反應，茲將本反應與普通平板凝集反應及補體結合反應比較所得之成績報告於後，敬請先進賜教。

二 材 料 與 方 法

1. 普通凝集抗原：普通平板凝集反應用抗原乃本所出品之牛流產病診斷液，為每 cc 含有加熱殺死並經洗滌之 11% *Br. abortus* 之 0.5% 石炭酸食鹽水泥懸液。

2. 酸性凝集抗原：為決定平板凝集抗原中所加之水醋酸量與血清及抗原混合後 PH 之關係起見，先於一定量抗原中增量地加入水醋酸以測定抗原之 PH 後將這些各不同 PH 之抗原以 3:8, 3:4, 3:2 之比例加入血清中，以測定平板凝集反應中 1:25, 1:50, 1:100 反應之 PH 價。(為便利起見，於本報告中稱 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 ml. 血清與 0.03 ml. 抗原之混合液為平板反應之 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 倍反應)

由表 I 可知，每 ml. 抗原中加入 0.06~0.07 ml. 水醋酸時，1:25 倍血清—抗原混合液之 PH 可在最佳緩衝域 (buffer system)。故於本試驗，使用每 ml. 標準診斷液中加入 0.06~0.07 ml. 水醋酸之酸性抗原。

Table I
PH of Acidified Antigens and of Serum-Acidified Antigen Mixtures

ml. concentrated acid/ml. of plate antigen	PH			
	Acidified antigen, alone	Mixtures		
		8Volums Serum, 3Volums antigen	4Volums serum, 3Volums antigen	2Volums serum, 3Volums antigen
Acetic acid (100%)				
0	6.98	7.70	7.40	7.36
0.01	3.75	5.31	4.85	4.43
0.02	3.50	4.61	4.48	4.10
0.03	3.36	4.36	4.30	3.96
0.04	3.25	4.22	4.19	3.85
0.05	3.20	4.12	4.05	3.74
0.06	3.11	4.01	3.96	3.70
0.07	3.09	3.98	3.87	3.60
0.08	3.03	3.90	3.86	3.58
0.09	3.01	3.87	3.82	3.52
0.10	3.00	3.82	3.79	3.50
0.12	2.90		3.70	3.48
0.13	2.89	3.77		
0.14	2.89	3.53		

註) 1. 使用抗原爲本所出品之 Lots No. 24, No. 25 成品。

2. 血清係爲五頭以上乳牛之混合血清。

3. 血清：乃經 56°C30 分非動性化後在普通平板凝集反應中呈 25 倍反應以上之乳牛血清共 231 頭。

4. 平板凝集反應：依照通常使用之平板凝集反應法。

5. 補體結合反應：在血清實量 0.02ml. 以下阻止溶血者爲陽性反應，而在 0.05ml. 阻止溶血者爲疑陽性反應。

三 試 驗 結 果

1. 酸性抗原平板凝集反應與普通平板凝集反應之關係：就普通平板凝集反應中呈 25 倍以上之 231 頭乳牛血清實施該二反應後結果之比較如表 II。

Table II
Comparison of Standard Plate Test with Acidified Plate-Antigen Test on Sera from 231 head of Suspect Animals

Plate Test					
Standard Test			APA Test		
Titers	No. of Sera	%	Titers	No. of Sera	%
0	0	0	0	21	9.09
×25	3	1.29	×25	57	24.67
×50	3	1.29	×50	71	30.73
×100	79	34.19	×100	51	22.07
×200	73	31.60	×200	21	9.09
×400 or over	73	31.60	×400 or over	15	6.49
Total	231	(100 %)	Total	231	(100 %)

註) 1. APA Test : Acidified Plate-Antigen Test.

2. Table II is the Summary of the Table I.

	Standard Test					APA Test					×400
	×25	×50	×100	×200	×400	×0	×25	×50	×100	×200	
	3	3	79	73	73	3					
						3					
						14	44	19	2	0	0
						0	8	41	19	5	0
						1	0	11	30	16	15
Total	3	3	79	73	73	21	52	71	51	21	15

由表Ⅱ可知，在普通平板凝集反應中呈 100 倍以上者 225 頭 (占 97.40 %)，在酸性抗原平板凝集反應中呈 25 倍以上者 210 頭 (占 90.91 %)。

2. 酸性抗原平板凝集反應及普通平板凝集反應與補體結合反應之比較：

就 98 頭，在普通平板凝集反應中呈 100 倍以上凝集價之乳牛血清實施酸性抗原平板凝集反應及補體結合反應之結果比較如表Ⅲ。

Table III A
Comparison of Standard Plate Test with Complement Fixation Test

Test	Standard Plate Test Titers			C F Test Titers				
	×100	×200	×400 or over	0	0.1	0.05	0.02	0.01
No. of Sera	4	25	69	4	2	2	2	2
				17	2	2	1	13
				51	2	2	1	13
Total	4	25	69	72	4	4	3	15

Table III B
Comparison of Acidified Plate Agglutination Test with Complement Fixation Test

Test	APA Test Titers				CF Test Titers				
	×50	×100	×200	×400 or over	0	0.1	0.05	0.02	0.01
No. of Sera	14	52	16	16	14	4	3	2	1
					42	0	0	1	2
					13	0	1	0	12
					3	0	1	0	12
Total	14	52	16	16	72	4	4	3	15

由上表可知，在普通平板凝集反應 (以下簡稱 SPA Test) 中呈 100 倍以上凝集價之 98 頭中 CF 陽性者 18 頭 (占 18.36 %)，疑陽性者 4 頭 (占 4.18 %)；在酸性抗原平板凝集反應中 (以下簡稱 APA Test) 呈 100 倍以上凝集價之 84 頭中 CF 陽性者 18 頭 (占 21.42 %)，疑陽性者 4 頭 (占 4.76 %)。在 SPA Test 中呈 200 倍以上凝集價之 94 頭中 CF 陽性者 18 頭 (占

19.14 %), 疑陽性者 4 頭 (占 4.25 %); 在 APA Test 中呈 200 倍以上凝集價之 32 頭中, CF 陽性者 15 頭 (占 46.87 %), 疑陽性者 1 頭 (占 3.12 %)。在 SPA Test 中呈 400 倍以上凝集價之 69 頭中, CF 陽性者 14 頭 (占 20.29 %), 疑陽性者 2 頭 (占 2.99 %); 在 APA Test 中呈 400 倍以上凝集價之 16 頭中, CF 陽性者 12 頭 (占 75.%) , 疑陽性者 1 頭 (占 6.25 %)。

即以 100 倍以上凝集價為標準時 APA Test 之 CF 陽性率比 SPA Test 者高 3.06 %。200 倍以上凝集價為標準時 APA Test 之 CF 陽性率比 SPA Test 者高 27.73 %。400 倍以上凝集價為標準時 APA Test 者高 54.71 %。

概言之 APA Test 成績較 SPA Test 者接近 CF 反應之成績, 至於在 APA Test 尚呈陽性而在 CF Test 呈陰性之原因須待爾後按期檢查及人工接種試驗方可決定。(其中雖有一部份牛隻於輸入前已在澳洲接種過 Strain 19 疫苗, 但據謂均已經一年以上)。

3. 使用未經非働性與經非働性血清之酸性抗原平板凝集反應; 就各種凝集價之血清於非働性前及非働性後實施酸性抗原凝集反應之結果如表 IV。

Table IV
APA Test with Active and Inactivated Sera

Serum No.	APA Test									
	Active Sera					Inactivated Sera				
	×25	×50	×100	×200	×400	×25	×50	×100	×200	×400
116	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-
121	+++	++	+	+	-	+++	++	+	+	-
124	+++	++	+	-	-	+++	+	+	-	-
161	+++	++	+	-	-	+++	++	+	-	-
200	+++	++	+	±	-	+++	++	+	-	-
172	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

由上表可知, 於酸性抗原凝集反應中, 血清經非働化與否其凝集價均相同。

四 討 論

Roepke 認為在非污染牧場, 酸性抗原平板凝集反應 25 倍不呈凝集者可能為陰性牛。本試驗發現在普通平板凝集反應呈 100 倍以上凝集者 225 頭中在酸性抗原平板凝集反應 25 倍不呈凝集反應者 15 頭 (占 6.66%) 該 15 頭乳牛是否為非特异性反應牛尚待調查該等牧場之污染情形做進一步之研究。本試驗發現酸性抗原平板凝集反應之成績較普通平板凝集反應者接近補體結合反應之成績。至於在酸性抗原平板凝集反應中尚呈 100 倍以上凝集價而在補體結合反應中呈陰性之原因, 須待以後之研究始可決定。(其中雖有一部份牛隻, 於輸入前已在澳洲注射過 Strain 19 疫苗, 但據謂均已經一年以上)。

五 結 論

余等曾依 Rose 與 Roepke 之方法修正本所出品之標準布氏桿菌病診斷液之 PH; 並就普通平板凝集反應中呈 25 倍以上凝集價之乳牛血清 231 頭實施平板凝集反應與補體結合反應之結果概述如下:

1. 使用 Glass Electrode PH meter 測定之結果得知加 0.06~0.07 ml 冰醋酸於 1ml 之布氏桿菌病診斷液 (抗原), 可使該診斷液之 PH 降為 3.11~3.09。即加 0.03ml 之該酸性抗原於 0.08 ml 之血清 (即平板凝集反應之 1:25 倍反應) 時, 該血清-抗原混合液之 PH 可在 4.0 左右。即為阻止平板凝集反應非特异性之最佳緩衝域 (Buffer system)。

2. 加酸後之抗原，如妥為保存，在一星期內者似尚可應用，但為成績正確起見，於使用直前加水醋酸為宜。

3. 於普通平板凝集反應中呈 25 倍以上凝集價之 231 頭乳牛血清中，在普通平板凝集反應中呈 100 倍以上者 225 頭 (97.40%) 在酸性抗原平板凝集反應中呈 25 倍以上者 210 頭 (90.91%)。

4. 與補體結合反應比較時，由初步結果得知：

以 100 倍以上凝集價為標準時，酸性抗原平板凝集反應陽性牛之補體結合反應陽性率比普通平板凝集反應者高 3.06%。以 200 倍以上凝集價為標準時則高出 27.73%。以 400 倍以上凝集價為標準時則高出 54.71%。

本試驗承蒙黃所長文池校閱，臺大化學系王松堯先生，及本所細菌室各同仁之協助，特此誌謝。

References

1. Rose, J.E. & Roepke, M.H. : An Acidified Antigen for Detection of Nonspecific Reactions in the Plate-Agglutination Test for Bovine Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.*, 18, (1953) : 550-555.
2. Hess, W.R. Studies on a Nonspecific Brucella-Agglutinating Substance in Bovine Serum. I. The Differentiation of the Specific and Nonspecific Agglutinins by Heat Treatment. *Am. J. Vet. Res.*, 14, (1953) : 192-194.
3. Hess, W.R. : ditto, II. Isolation and Purification of the Brucella-Agglutinating Substance. *ibid.*, 14, (1953) : 195-197.
4. Morse, E.V., Schneider, D.W., & McNutt, S. H. : The Effect of Incubation at 56 C on the Tube-Agglutination Test for Bovine Brucellosis. *ibid.*, 16, (1955) : 269-273.
5. Stableforth, A. W. : "Animal Brucellosis" in *Advances in the Control of Zoonoses*. Pp. 71-87, FAO Agricultural Studies No: 25, 1953.
6. Wilson, G.S. & Miles, A.A. : "Diagnosis of Undulant Fever", "Contagious Abortion in Cattle". in *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity Vol. II*. Pp. 1908-1923, 1957.
7. Fukuda, S. & Futamura, H. : Complement Fixation and Agglutination Reaction of Bovine Infectious Abortion", in *English Summaries of the Studies on Brucellosis in Japan*. FAO/WHO Brucellosis Center, NIAH, Japan, 1958.
8. Watanuki, T. & Fujii, T. : Evaluation on of Rapid Agglutination Test for the Diagnosis of Brucellosis Caused by Bang's Bacillus. *ibid.*, 1958.
9. Kawashima, H., Ando, K., Yoshida, T., Mifune, R., & Isayama, Y. : Comparison of the Diagnostic Value on Bovine Brucellosis between Agglutination Test and Complement Fixation Test. *ibid.*, 1958.
10. Liu, J. Y. Lu, J. S., & Shieh, T.M. : Experimental Injection of Native Domestic Animals with *Br. abortus* with Special Reference to its Serology. *Exp. Rep. of Taiwan Prov. Vet. Serum Inst. No. 2*. 1958.
11. 濱田輔一：關於臺灣的牛傳染性流產菌症，臺灣農林第 8 卷第 6 期 1954. pp. ~34.
12. 黃文池、李太矜、林薰竹：臺灣耕牛傳染性流產菌病檢驗報告，中華農學會報新 No. 12, 1955
13. 李太矜、王宗枝：本省傳染性流產菌血症血清學診斷之研究，臺灣農林，第 8 卷，第 10 期 1954. p. 34~37

Studies on Rose-Roepke's Acidified Plate-Antigen Test for Bovine Brucellosis

(1) Comparison With Complement Fixation Test

T.J. Yang; J.S. Kau; Y.P. Chan; C.C. Wang

Taiwan Provincial Institute of Animal Health,
Tamsni Taiwan

Rose and Roepke's Acidified Plate-Antigen Test (APA) was investigated and compared with standard plate-antigen test (SPA) and complement fixation test on 231 bovine sera. The results seem to be very promising and they are summarized as follows :

1. Preparation of Acidified Plate Antigen :

The antigen used was the "Brucella abortus antigen (Plate method)" produced by the Institute for the animal brucellosis control program in Taiwan. pH was adjusted with glacial acetic acid by glass electrode pH meter (Toa Denpa Co.) It was found that when 0.06 to 0.07 ml of glacial acetic acid was added to 1ml of standard Brucella plate antigen, the pH of the antigen would drop to 3.11 to 3.09. When 0.03 ml of this antigen was added to 0.08 ml serum as in the 1:25 dilution of the plate test, the resulting mixture had pH of about 4.0.

2. Of the 231 Sera with SPA titers higher than 1:25 225 (97.40%), had SPA titers higher than 1:100, Whereas 210 (90.9%) had APA titers higher than 1:25.

3. In comparing the APA and SPA test with the complement fixation test, closer agreement to CF test was seen in agglutination test by the APA method, i.e., 3.06% closer agreement was seen in APA test than in SPA test when agglutination titers of higher than 1:100 were considered to be significant; 27.73% closer agreement was seen in APA test than in SPA test when agglutination titers of higher than 1:200 were considered to be significant; and 54.71% closer agreement was seen in APA test than in SPA test when agglutination titers of higher than 1:400 were considered to be significant. (the CFT of 0.02 cc. or less was considered to be CF positive in the experiment).

4. It was found that the agglutination titers of APA test were the same whether the sera were inactivated (56° C. 30 min.) or not.

1. Reprinted from The Journal of The Taiwan Association of Animal Husbandry and Veterinary Medicine No.3: 1959