

牛布氏桿菌病及羊布氏桿菌病檢驗方法 修正規定

一、布氏桿菌病(Brucellosis)係由布氏桿菌(*Brucella abortus*、*B. melitensis* 或 *B. suis*)感染所引起，本檢驗方法係針對動物傳染病分類表中的牛布氏桿菌病(Bovine brucellosis)及羊布氏桿菌病(Caprine and ovine brucellosis)而定。

二、檢驗方法：

(一) 生體檢查方法：

1. 動物血清以玫瑰苯試驗(Rose bengal test，以下簡稱RBT)檢驗為初驗，RBT 檢驗呈陰性反應之血清樣本判定為陰性，RBT 檢驗呈現陽性反應之血清樣本再以補體結合試驗(Complement fixation test，以下簡稱CFT)檢驗。
2. CFT 檢驗呈陰性反應之血清樣本判定為陰性；CFT 檢驗呈陽性反應之血清樣本，再以間接酵素連結免疫吸附反應試驗(indirect ELISA，以下簡稱 iELISA)檢驗。
3. iELISA 檢驗呈陰性反應之血清樣本判定為陰性；iELISA 檢驗呈陽性反應之血清樣本來源動物，經剖檢後，採集母畜子宮內容物、陰道分泌物、乳房、乳汁(公畜則採睪丸、副睪或精液)、脾臟、主要淋巴結(如頭部、乳房或生殖道等淋巴結)、關節囊液或囊腫液等檢體進行病原檢驗。
4. 流產案例之流產胎兒(胃內容物、脾臟和肺)、胎膜，以及母畜之陰道分泌物等檢體，以病原檢驗結果為依

據。

(二) 玫瑰苯試驗(Rose bengal test, RBT)：

1. 檢驗試劑：

- (1) 標準陽性血清：依世界動物衛生組織(WOAH)規定所生產之商品化陽性血清。
- (2) RBT 使用之抗原：依 WOAH 規定所生產之商品化抗原。

2. 操作步驟：

- (1) 將 RBT 使用之抗原、標準陽性血清(對照用，每天檢驗前做 1 次即可，步驟同待測血清)及待測血清回溫至 $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ 。
- (2) 將血清各 25-30 μl 置於適當之玻璃板(白瓷板或塑膠板亦可)上。
- (3) 將 RBT 使用之抗原溫和搖勻，滴與血清等量(25-30 μl)之抗原於血清之一側。
- (4) 以塑膠棒或玻璃棒將抗原及血清充分混勻，使成直徑約 2 cm 圓形或橢圓形混合液。
- (5) 溫和搖晃玻璃板使混合液充分混合約 4 分鐘後立即判讀。

3. 檢驗結果判讀：

- (1) 任何可見之凝集都視為陽性反應(如圖 1)。
- (2) 標準陽性血清需為陽性反應，否則需重複進行試驗。
- (3) 待測血清樣本若為陽性反應，須進行補體結合試驗作為複驗；若無陽性反應，則直接判定為陰性。

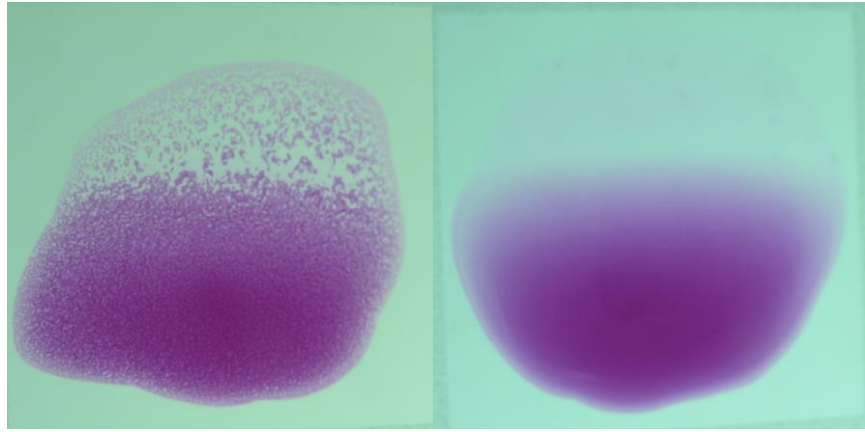


圖 1. RBT 檢驗結果，左為陽性反應，右為陰性反應。

(三) 補體結合試驗(Complement fixation test, CFT)：

1. 檢驗試劑：

- (1) CFT 使用之抗原：依 WOAAH 規定生產之商品化抗原。
- (2) CFT 使用之緩衝液：依 WOAAH 推薦。
- (3) 補體：商品化冷凍乾燥之天竺鼠補體粉末，以無菌水回溶後分裝保存於 -70°C 。力價測定方法為將連續稀釋之補體液 25 μl 加入 50 μl CFT 使用之緩衝液及 50 μl 致敏化紅血球，於 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 30 分鐘作用後，產生 50% 溶血之補體力價稱為 1 單位，試驗使用之補體力價為 6 單位，每批補體皆需測試。
- (4) 溶血素：抗綿羊紅血球之兔抗血清，添加無菌水回溶。
- (5) 致敏化紅血球：新鮮綿羊紅血球以 CFT 使用之緩衝液稀釋成 3%，以等體積之 CFT 使用之緩衝液(含適當比例之溶血素)混勻，於 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 感作一夜後完成。此致敏化紅血球在 1 單位補體作用下

可產生 50% 溶血，每批致敏化紅血球皆需測試。

2. 操作步驟：

- (1) 將所需之試劑及待測血清回溫至 $22^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ 。
- (2) 取標準陽性血清及待測血清各 $40\ \mu\text{l}$ 加入 CFT 使用之緩衝液 $40\ \mu\text{l}$ ，於 $58^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 作用 50 分鐘，各加入 $80\ \mu\text{l}$ CFT 使用之緩衝液成 4 倍稀釋血清。
- (3) 使用 96 孔標準「U」型盤進行實驗，每血清使用一列 8 個孔，第 1 至 8 孔(除第 2 孔外)預先加入 CFT 使用之緩衝液 $25\ \mu\text{l}$ 。
- (4) 將 $25\ \mu\text{l}$ 稀釋血清分別加於第 1 至 3 孔，第 1 孔為抗補體檢驗孔。
- (5) 第 3 孔以微量吸管混勻後吸出 $25\ \mu\text{l}$ 加於第 4 孔，以此法連續兩倍稀釋至最後第 8 孔，最後第 8 孔吸出之 $25\ \mu\text{l}$ 丟棄。因此，稀釋倍數由第 2 至 8 孔依序為 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍及 256 倍。
- (6) 將 $25\ \mu\text{l}$ CFT 使用之抗原依序加於第 2 孔至最後第 8 孔。
- (7) 將 $25\ \mu\text{l}$ 補體依序加於第 1 至 8 孔，最終每孔體積為 $75\ \mu\text{l}$ 。
- (8) 96 孔盤置於振盪器震盪 2 分鐘後， $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 作用 30 分鐘或 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 隔夜充分感作。
- (9) 將致敏化紅血球回溫至 $22^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ 。
- (10) 每孔添加 $50\ \mu\text{l}$ 致敏化紅血球，96 孔盤置於振盪

器震盪 2 分鐘後， $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 作用 30 分鐘。

(11) 移回 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 2~3 小時或於 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下 1000g 離心 10 分鐘，讓未溶解血球沉澱。

3. 對照組製備：

(1) 完全溶血、50 % 溶血及不溶血對照之製備：完全溶血對照係取 50 μl 致敏化紅血球溶液經 3 次冷凍、解凍，加入 75 μl CFT 使用之緩衝液即成。

50 % 溶血對照係取 25 μl 致敏化紅血球溶液經 3 次冷凍、解凍，加入 25 μl 致敏化紅血球溶液及 75 μl CFT 使用之緩衝液即成。不溶血對照係將致敏化紅血球溶液 50 μl 加入 75 μl CFT 使用之緩衝液而成。

(2) 製備補體對照組：補體 25 μl 加 CFT 使用之緩衝液 50 μl ，再加致敏化紅血球溶液 50 μl 。

(3) 製備抗原對照組：抗原 25 μl 、補體 25 μl 及 CFT 使用之緩衝液 25 μl ，再加致敏化紅血球溶液 50 μl 。

4. 檢驗品質管控：

(1) 對照組之品質控制：不溶血對照組應不溶血(如圖 2 左)，補體對照組及抗原對照組應完全溶血(如圖 2 右)，若不符合此預期，需重新檢驗。

(2) 每列第 1 孔抗補體檢驗孔如出現非完全溶血，顯示有抗補體反應，試驗需重新進行；若試驗重測後仍有抗補體反應，則需重新採取血清樣品。

(3) 標準陽性血清抗體力價應高於 64 倍，否則需重

複進行試驗。

5. 檢驗結果判讀：

- (1) 與溶血對照組比較，當每列出現不溶血至 50% 溶血（如圖 2 中）判為陽性，50% 溶血至完全溶血判為陰性。每列產生陽性之最高稀釋倍數即為血清之抗體力價。
- (2) 血清抗體力價小於 4 倍判定為陰性；抗體力價等於或大於 4 倍判定為陽性；但初次送檢及重新採樣之血清樣本皆為 CFT 抗補體反應則亦判定為陽性。

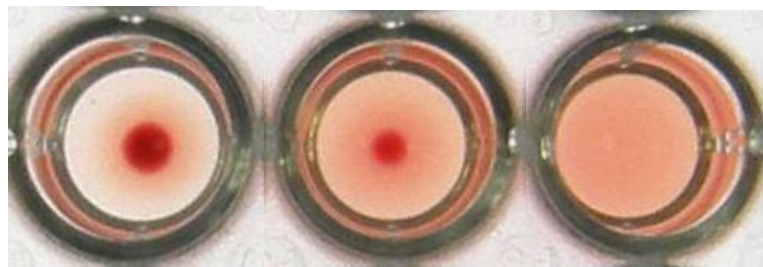


圖2.由左至右分別為不溶血、50%溶血及完全溶血。

(四) 間接酵素連結免疫吸附反應(indirect ELISA, iELISA)：
有關 iELISA 檢驗步驟及結果判讀，參照市售商品化檢測套組之使用說明書。

(五) 病原檢驗方法：

1. 細菌分離：

(1) 檢驗試劑：WOAH 推薦之選擇性培養基。

(2) 操作步驟：

- I. 臟器組織乳劑以鈎菌環取樣，胃內容物、子宮內容物和陰道分泌物等則直接取樣，塗抹於選擇性培養基。

- II. 以 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 5-10% CO_2 培養。
- III. 約 3-4 天後觀察是否有菌落生長。培養物在 7-10 天後若為陰性才可丟棄。
- IV. 可疑菌落加入 200 μl PBS, 99°C 10 分鐘不活化後，上清液進行 Real-time PCR 及 Bruce-ladder PCR 與產物定序。

2. Real-time PCR :

(1) 檢驗試劑 :

I. 引子 :

目標	引子名稱	引子序列(5'-3')
IS711	IS421 (Fd)	CGC TCG CGC GGT GGA T
	IS511 (Rv)	CTT GAA GCT TGC GGA CAG TCA CC

II. Real-time PCR 探針 :

目標	探針名稱	探針序列(5'-3')
IS711	ISTq	FAM - ACG ACC AAG CTG CAT GCT GTT GTC GAT G - TAMRA

(2) 操作步驟 :

- I. 臟器組織乳劑萃取之核酸或可疑菌落上清液，依照以下配方配製試劑，進行 Real-time PCR 程序。

Real-time PCR 配方	
	試劑組成(μl)

超純水	6.65
預混反應試劑[2x] (1x)	12.5
引子Fd [20 μM] (0.3 μM)	0.375
引子Rv [20 μM] (0.3 μM)	0.375
探針 [50 μM] (0.25 μM)	0.1
DNA	5
總體積	25

循環次數	溫度(°C)	時間	
		分鐘	秒
1	50	2	0
1	95	10	0
50	95	0	15
	60	1	0

II. 檢體 Ct 值小於 38 判為 Real-time PCR 陽性。

III. Real-time PCR 陽性反應者再進行 Bruce-ladder PCR 程序及電泳。

3. Bruce-ladder PCR :

(1) 檢驗試劑：Bruce-ladder PCR 引子：

引子名稱	序列(5'-3')	產物大小(bp)	說明
BMEI099 8f	ATCCTATTGCCCC GATAAGG	1,682	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆有此序列， <i>B. ovis</i> 或 <i>B. abortus</i> RB51 疫苗株缺失此序列。
BMEI099 7r	GCTTCGCATTTTC ACTGTAGC		
BMEI053 5f	GCGCATTCTTCGG TTATGAA	450	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆有 450bp 產物，海洋哺乳類布氏桿菌產物
BMEI053 6r	CGCAGGCGAAAA CAGCTATAA	(1,320)	

			為 1,320bp。
BMEII08 43f	TTTACACAGGCAA TCCAGCA	1,071	<i>B. abortus</i> 缺失此序列，僅 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 有此序列。
BMEII08 44r	GCGTCCAGTTGTT GTTGATG		
BMEI143 6f	ACGCAGACGACCT TCGGTAT	794	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆有此序列， <i>B. canis</i> 缺失此序列。
BMEI143 5r	TTTATCCATCGCC CTGTCAC		
BMEII04 28f	GCCGCTATTATGT GGACTGG	587	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆有此序列， <i>B. abortus</i> S19 疫苗株缺失此序列。
BMEII04 28r	AATGACTTCACGG TCGTTCG		
BR0953f	GGAACACTACGCC ACCTTGT	272	<i>B. abortus</i> 及 <i>B. melitensis</i> 缺失此序列，僅 <i>B. suis</i> 有此序列。
BR0953r	GATGGAGCAAAC GCTGAAG		
BMEI075 2f	CAGGCAAACCCTC AGAAGC	218	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆無此序列，僅 <i>B. melitensis</i> Rev.1 疫苗株有此序列。
BMEI075 2r	GATGTGGTAACGC ACACCAA		
BMEII09 87f	CGCAGACAGTGAC CATCAA	152	<i>B. abortus</i> 、 <i>B. melitensis</i> 或 <i>B. suis</i> 皆有此序列， <i>B. neotomae</i> 缺失此序列。
BMEII09 87r	GTATTCAGCCCC GTTACCT		

(2) 操作步驟：Real-time PCR 陽性反應者依照以下
配方配製試劑，進行 Bruce-ladder PCR 程序。

	試劑組成(μl)
超純水	15.1
緩衝液[10X] (1X)	2.5
MgCl ₂ [50 mM] (2mM)	1
引子預混[2.5μM] (12.5 pM)	5
dNTPs[25 mM] (200μM)	0.2
Polymerase[5U/μl] (1U)	0.2

DNA	1
總體積	25

循環次數	溫度(°C)	時間	
		分鐘	秒
1	95	7	0
25	95	0	35
	64	0	45
	72	3	0
1	72	6	0
1	4	∞	

(3) Bruce-ladder PCR 陽性者進行產物定序，定序鑑定為 *B. abortus*、*B. melitensis* 或 *B. suis*，即判為陽性。

三、結果判定：

- (一) 動物血清抗體檢驗陽性且經病原檢驗呈陽性者，判定為布氏桿菌病陽性案例。
- (二) 流產案例，病原檢驗呈陽性者，判定為布氏桿菌病陽性。
- (三) 布氏桿菌病陽性場管制期間之後續檢驗，以 RBT 檢驗為初驗，RBT 檢驗呈現陽性反應之血清樣本進行 CFT 複驗，CFT 檢驗呈現陽性反應之血清樣本判定為布氏桿菌病陽性。

四、參考文獻：

- (一) WOA. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022. CHAPTER 3.1.4.

BRUCELLOSIS (INFECTION WITH *B. ABORTUS*, *B. MELITENSIS* AND *B. SUIS*).

- (二) EU Reference Laboratory for Brucellosis. Standard Operating Procedure - *Brucella* real time PCR. 2019.
- (三) EU Reference Laboratory for Brucellosis. Standard Operating Procedure – Bruce ladder. 2020.
- (四) Lopez-Goni I, García-Yoldi D, Marín CM, Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa Sa MI, Walravens K, Albert D, and Garin-Bastuji B. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. J. Clin. Microbiol. 2008.