

## 使用 ELISA 方法檢測水禽(鴨)雷氏桿菌症血清抗體之研究

喻昭芳、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 緒言

由 *Riemerella anatipestifer* 引起的水禽雷氏桿菌症為台灣重要的水禽傳染病，主要造成病禽敗血症、全身性漿膜炎、恢復禽隻生長遲緩及不合格屠體增加。對於疾病的診斷，主要由臨床檢查、病理解剖、細菌分離與血清學鑑定，在血清學檢驗方面，常用的平板凝集試驗與瓊脂擴散試驗，二者皆可有效且快速的鑑定血清型別，但對於血清抗體力價的分析則敏感性尚嫌不足。本研究希望建立使用高敏感性與特異性的酵素免疫分析法(ELISA)，檢測與分析鴨血清抗體力價，並進而製作出標準預測趨勢線，改善前提兩項血清試驗方法之不足。

### 材料與方法

本次試驗主要是參考英國 Hatfield 等人(1987)及台灣大學獸醫學研究所劉育宗碩士論文(2002)之方法，材料與方法簡敘如後。一、抗原製備：第 1、2 及 6 血清型菌株 37℃、18 小時培養於血液培養基，菌落刮下後以 PBS 混勻，經多次離心洗菌，最後以 Coating solution 將菌調整濃度至 OD<sub>540</sub>=1.0，置入-20℃冰箱冷凍解凍 3 次，再將此菌液稀釋 8 倍後即為試驗用抗原。二、血清樣本：包括(1)兩場清淨場共三批 1 日齡、八週齡與 10 週齡鴨共 20 隻鴨血清、(2)兩場污染場共 11 隻鴨血清、(3)免疫 3 價不活化菌苗後連續 15 週採血 5 隻鴨血清。三、ELISA 方法：取專用平底 96 孔盤，每孔加入 100 μL 抗原液，於 4℃靜置 24 小時，吸去孔內液體並風乾，每孔加入 300 μL Washing buffer 清洗 3 次後風乾。血清樣本經 56℃水浴 30 分鐘非動化，以 2 倍連續稀釋，每孔加入 50 μL 稀釋血清後置於 37℃感作 60 分鐘，每孔再以 300 μL Washing buffer 浸洗 6 次後拋棄孔內液，每孔加入 50 μL 之 400 倍稀釋 Horseradish peroxidase 標示抗體 Goat-anti-duck IgG，置於 37℃感作 60 分鐘後以 Washing buffer 再次浸洗。於每孔中加入 100 μL ABT substrate 呈色劑，置於陰暗中作用 30 分鐘後加入 100 μL Stop solution 停止反應，並使用 ELISA reader 以波長 405nm 測定其吸光值。四、標準線性預測趨勢線製作：使用 ELISA 檢測 2 倍連續稀釋之不同濃度抗體血清，測得各血清樣本之 OD 值，OD 值為縱軸及稀釋倍數為橫軸以 Excel 電腦軟體繪出曲線圖，並畫出可同時經過所有樣本斜線的最低通過點，即為 Cut off value，再分別對應出稀釋倍數 End point titer 與其 OD 值後，最後可求出預測趨勢斜線。五、免疫第 1、2

和 6 血清型 3 價菌苗之抗體消長：求得 3 種血清型抗體的預測趨勢斜線後，即可推回免疫 3 價菌苗後第 1 週連續至第 15 週的血清抗體力價高低分佈情形。

## 結果與討論

由材料與方法中的第四項繪出血清的連續稀釋倍數與其 OD 值之曲線圖，再根據前提曲線圖繪出預測趨勢斜線，最後免疫 3 價菌苗後第 1~15 週抗體力價消長可由預測趨勢線推算出(如圖 1 和 2)。免疫 3 價菌苗之血清、污染場與清淨場血清對第 1、2 和 6 血清型抗原以 ELISA 檢測後呈現高與低的背景值(OD<sub>405</sub>)，血清在 100 倍(RA 1 及 2)、1600 倍(RA 6)稀釋下，OD 值介於 0.205 ~ 0.888(RA 1)、0.340~1.031(RA 2)及 0.091~0.816(RA 6)；至於在清淨場的血清樣本，95%樣本的 OD 值則在 0.090 內(RA 1)、0.090 內(RA 2)及 0.082 內(RA 6)，兩者有顯著差異。本次試驗利用 ELISA 檢測不同濃度抗體血清，測得各血清樣本之 OD 值，製作出 OD 值與抗體力價關係的預測線性趨勢線，擬利用此趨勢線進而可由測定之 OD 值快速得知抗體力價，但蒐集之血清樣本數尚嫌不足，可能因此造成趨勢線之 R squared 值較低，致影響了趨勢線之可靠性。由趨勢線顯示免疫 3 價菌苗後之抗體消長，第 1 及 2 血清型免疫後抗體由 200~400 倍開始緩慢爬昇，於第 6 週至 800 倍，而第 6 血清型從 800 倍上升至第 6 週 25,600 倍，3 種血清型皆於第 11 週達到高峰 1600~3200 倍、51,200 倍後緩降。由此可知，免疫死菌菌苗後可引起鴨體內不低的抗體力價，至於菌苗的效力與血清抗體力價之相關性，是否力價高表示菌苗的保護力較佳呢？則仍需再作更進一步的試驗佐證之。使用 ELISA 方法檢測不同血清型抗體，在 96 孔盤 Coating 上相對應的抗原為全菌抗原，不同血清型間之共同抗原部份並未排除，可能因此導致血清非特異性反應增加，找出個別血清型之特異性抗原作為 ELISA 用抗原應可改善之。

Fig.1: The levels of sera antibodies to RA in ducks vaccinated with RA serotypes 1,2 and 6 bacterin. Values were end point titers obtained from the prediction curve.

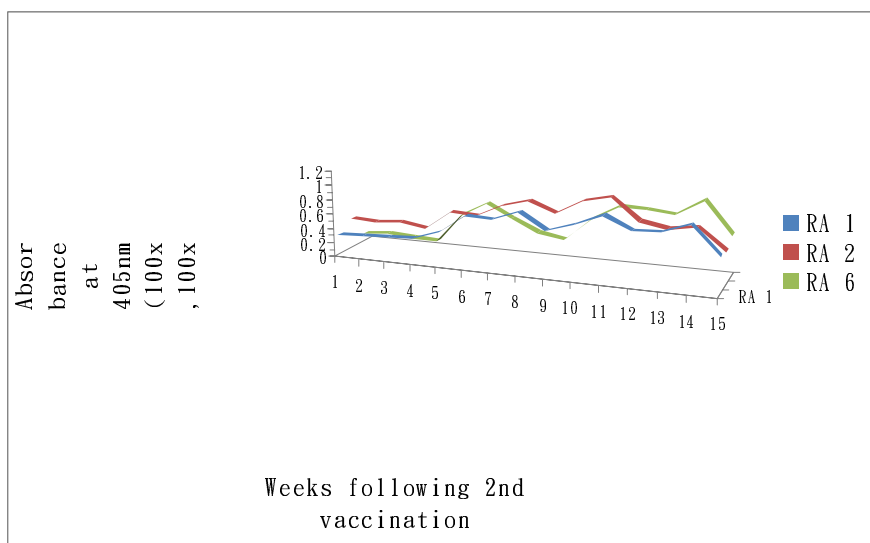


Fig.2: The levels of sera antibodies to RA in ducks vaccinated with RA serotypes 1,2 and 6 bacterin. Values were end point titers obtained from the prediction curve.

