

# 應用酵素結合免疫吸附分析(ELISA)方法檢測牛白血病

林敬覆\*、張惟茗、吳義興、蘇杰夫、蕭終融

行政院農業委會家畜衛生試驗所

**摘要** 分別以一般含胎牛血清之組織培養生長液 (Hank's MEM solution 90 % 及 gentamycine 0.04 mg/mL, A) 及不含胎牛血清之代用添加完全組織培養生長液 (basal medium supplement solution 及 gentamycine 0.04 mg/mL, B: 係 Biochrom KG 廠商業成品) 大量增殖持續感染牛白血病病毒 (bovine leukemia virus; BLV) 之 FLK 細胞, 再將所收集之培養液, 經離心, 不活化處理及濃縮處理後, 分別製得粗抗原 A-Ag 及 B-Ag。再應用上述粗抗原分別以瓊膠免疫擴散法 (agar gel immunodiffusion test; AGID) 測定牛隻白血病 (bovine leucosis, BL) 抗體, 結果以 B-Ag 為抗原者較佳, 二者分別為 38.74 % (289/746) 及 39.41 % (294/746), 接著將所製得之 B-Ag 粗抗原, 以 Sephacryl S-300 層析所收集之各階收集液, 進行免疫轉置 (immunoblot) 分析後, 取其第一峰之收集液, 以硫酸銨濃縮透析後, 經光電比色計分析後, 再將濃度調到 5 µg/mL, 製成牛白血病 (BL) 抗體測定用之 BL antibody test ELISA-plate (BL-AbT-ELISA-plate), 以其與 AGID 進行牛隻 BL 陽性牛抗體檢測結果, 分別為 38.84% (294/757) 及 36.20% (274/757)。

**關鍵字：**牛白血病，瓊膠免疫擴散法，酵素結合免疫吸附法

## 緒 言

本病係為一種慢性病毒性傳染病，歷年來對養牛業者所造成之經濟損失實在無從估計，早在 1987 年楊等調查台灣地區 31,518 頭乳牛血清之牛白血病 (BL) 抗體, 結果發現以瓊脂免疫擴散法 (AGID) 測定顯示其陽性反應率達 17.31% (5,466/31,518) [3]，可見本病已嚴重為害台灣地區乳牛，由於以 AGID 測定本病，其操作繁複且費時，為簡化操作程序，縮短其測定時間及增加其敏感度，以提升診斷品質及時效，同時藉以所測得之結果加以分析比較，以瞭解本病之流行病

學現況，而進行本計畫，今就所使用之方法、材料及結果等，分述於下。

## 材料與方法

分別以含胎牛血清培養基 (A) 及不含胎牛血清之添加完全細胞生長液 (B) 大量增殖持續感染牛白血病病毒 (BLV) [4, 6, 7, 8] 之 FLK 細胞，再將所收集之培養液，以 7,000 rpm 離心 30 分鐘以除去其細胞碎片後，將其上清液加入 0.003 M BEI，於 37 °C，不活化處理 24 小時，再以 30% 硫酸銨鹽析後，經以聚乙二醇-35,00 濃縮 1/200 倍，分別製得粗抗原 A-Ag

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

及 B-Ag，除做為測定瓊膠免疫擴散法〔1, 2, 3, 5, 9〕之抗原外，取一部份以 Sephacryl S-300 層析，再將其收集液經以斑點免疫法 (dot blot assay)〔1, 2, 5, 9〕分析後，收集其層析第一峰 (收集管 16-21 管) 之收集液，以硫酸銨濃縮後，再以 0.05 M pH 9.6 之碳酸鈉溶液 (含 0.02 %  $\text{NaN}_3$ ) 將其濃度調到 5  $\mu\text{g/mL}$ ，並固定 (Coating) 於 ELISA 專用之 96 孔培養皿 (96-well plate) 孔內，以製成牛白血病 (BL) 抗體測定用之牛白血病抗體測定用之酵素結合免疫吸附分析皿 (BL antibody test ELISA-plate, BL-AbT-ELISA-plate)，以與 AGID 同時進行，檢測於 2001 年各縣市檢送牛流行熱 (Bovine ephemeral fever, BEF) 監控血清之 BL 陽性抗體〔1, 2, 5, 9〕，以便將其結果，進行分析比較。

## 結 果

依上述兩種不同培養液，分別製得之 BL 粗抗原 A-Ag 及 B-Ag 分別為 70 mL 及 50 mL，為瞭解二者之性狀，先行分別以 AGID 逢機取樣 21 縣市所檢送之牛隻 BEF 監控血清 746 支，進行測定牛隻 BL 之抗體，結果以 B-Ag 為抗原者較佳，其陽性率分別為 38.74% (289/746) 及 39.41% (294/746)。

接著再以較佳之粗抗原 B-Ag 所製成之測定 BL 抗體用之 BL-AbT-ELISA-plate 與 AGID 同時進行檢測桃園縣等七個縣市牛隻血清共計 757 支之 BL 抗體，結果分別為 38.84% (294/757) 及 36.20% (274/757)，詳如表 1 (Table 1)。

Table 1. Serologic investigation by ELISA and AGID on BL in Taiwan

District	ELISA% (No. of affected/no. of tested)	AGID % (No. of affected/no. of tested)	1987 AGID % (No. of affected/no. of tested)*
Taoyuan County	27.90(12/43)	25.58(11/43)	21.24(447/2,105)
Hsinchu County	46.43(39/84)	44.05(37/84)	27.62(87/315)
Hsinchu City	41.67(30/72)	40.28(29/72)	40.74(165/405)
Miaoli County	41.23(47/114)	39.47(45/114)	21.25(630/2,965)
Chiayi County	36.22(67/185)	32.97(61/185)	26.63(506/1,900)
Tainan County	52.38(88/168)	49.40(83/168)	17.25(1,234/7,152)
Pingtung County	12.09(11/91)	8.79(8/91)	9.54(350/3,668)
Total	38.84(294/757)	36.20(274/757)	

\* Ref. No.3

## 討 論

依上述方法分別所製得之粗抗原 A-Ag 及 B-Ag，於處理過程中，B-Ag 經濃縮透析後，其濃縮液比較黏稠，於進行 AGID 試驗時，所用抗原之稀釋倍數準確度較難控制，故本計畫外持續進行之例行工作 AGID 測定時，均採用 A-Ag，至今已測定 BL 陽性率為 38.19% (406/1,063)，其與 1987 年調查台灣地區 21 縣市乳牛 BL 陽性率為 17.31% (5,466/31,518)〔3〕之結果比較高出許多，由此可見本病已日趨嚴重。

以試製之 BL-AbT-ELISA-plate 與 AGP 之

測定 BL 陽性牛結果，分別為 38.84% (294/757) 及 36.20% (274/757)，初步結果前者較後者之敏感度高 (Table 1)，但由於陽性牛隻血清大量取得困難，故未能將製備 BL-AbT-ELISA-plate 之抗原進行 Western blot 測定其分子量，故擬繼續蒐集大量陽性牛血清，進行 A-Ag 及 B-Ag 之 Western blot 分析後，再比較 BL-AbT-ELISA-plate 與 AGID 之敏感度及特異性，以供量產時之參考。

本次從各縣市檢送監控 BEF 血清中測定桃園縣等七個縣市乳牛 BL 之陽性率之結果與 1987 年所測定之結果比較〔3〕，本病感染率有逐年增加之趨勢，因此建議各縣市乳牛場，除應

逐年篩檢、淘汰 BL 感染牛外，同時於新購牛隻入場時，均應先行檢測、隔離 4 週後，再度檢測，確定無感染本病後，放入牛群，以期早日清除本病。

## 參考文獻

1. 吳義興。應用酵素標示免疫吸附法 (ELISA) 測定本省牛布氏桿菌血清抗體。中華民國獸醫學會。第 13 卷 109-117, 1987。
2. 張惟茗 賴秀穗。豬胸膜肺炎放線桿菌第 1 型細胞毒素之定性。中華民國獸醫學會。第 22 卷 第 6 期：394-401, 1996。
3. 楊揚輝、吳義興、蕭終融、李新進、黃金城、廖述吉、李淑慧、張惟茗、邱仕炎。牛白血病診斷液之研製及台灣地區疫情調查。畜研報。23：1~6, 1987。
4. BourDarlington RJ, Digiacomo RF, Evermann JF. Bovine leukemia virus transmission by dehorning in dairy heifer. Vet Bulletin (56) 2: 122, 1045, 1986。
5. Doiz G, Moreno E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. Zentralbl Veterinarmed (B) 46 (8): 551-558, 1999.
6. Evermann JF, Digiacomo RF, Parish SM. Transmission of bovine leucosis virus by blood inoculation. Am J Vet Res 47 (9): 1885-1887, 1986.
7. Henry ET, Devine JF, Coggins L. Rectal transmission of bovine in cattle and sheep. Am J Vet Res 48 (4): 634-636, 1987.
8. Lucas MH, Roberts DH, Wibberley. Ear tattooing as a method of bovine leucosis virus infection. British Vet J 141 (6): 647-649, 1985.
9. Mammerickx M, Portetelle JN, Burny A. Rapid detection of bovine leukemia virus infection in a large cattle population with an ELISA performed on pooled sera grouped by herd. Zentralblatt für veterinärmedizin 32 (8): 601-608. Vet Bulletin 2: 122, 1049, 1986.

# Diagnosis of Bovine Leucosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

King-fu LIN\*, Wei-Ming CHANG, Y. S. WU, J. F. SU, J. R. SHIAU

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

**SUMMARY** The FLK cells with bovine leucosis virus (BLV) persisting infection were cultured in Hank's base growth solution (containing 10% fetal calf serum and 0.04 mg/mL gentamycine, used for preparing the A antigen) and in basal medium supplement growth solution (Biochrom KG, used for preparing the B antigen). The supernatants were harvested, inactivated, concentrated, and prepared for antigen production. Both the A (A-Ag) and B (B-Ag) antigens were used for the agar gel immunodiffusion (AGID) test and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 746 bovine sera collected from 21 prefectures were tested with the A-Ag and B-Ag in the AGID test. Results indicated that the positive rates were 38.74% (289/746) for the A antigen and 39.41% (294/746) for the B antigen. In ELISA, the coating antigen was prepared from B antigen fractionated with Sephacryl S-300. The ELISA-plates were coated with the purified B antigen for overnight at 4°C. Serum samples from 7 prefectures were assayed for anti-BLV antibodies with ELISA and AGID test. Results showed that positive rates were 38.84% (394/757) for ELISA and 36.2% (274/757) for the AGID test.

*Keywords: Bovine leukemia virus, Agar gel immunodiffusion test, Enzyme-linked immunosorbent assay*

---

\*Corresponding Author  
National Institute for Animal Health