

口蹄疫抗體區別診斷試劑之研發

報告人：陳姿菡 助理研究員（豬瘟研究組）

壹、緒言

口蹄疫（FMD）為偶蹄類動物之高度傳染性疾病，主要感染的經濟動物如牛，豬和綿羊。FMD 常以發燒、水泡、嘴、舌頭，鼻孔，口鼻，腳和乳頭的上皮的腐爛等症狀為特徵。口蹄疫病毒（FMDV）是一個正股 RNA 病毒在 Picornaviridae 之成員中隸屬於 Aphthovirus 屬，為小的無封套病毒含有 8.5 kbp 基因可轉譯出結構與非結構蛋白（NSPs）。本病毒含有 7 種血清型包括 O，A，C，Asia 1，SAT 1，SAT 2，和 SAT 3 等分佈在全世界，而每個血清型無交叉保護作用。此疾病在臨床上仍無法與豬水疱病（SVD）、豬水泡性口炎（VS）、豬水泡疹（VE）等作出有效地區別診斷。目前國內檢測豬口蹄疫非結構蛋白抗體為酵素連結免疫吸附法（ELISA），是世界動物衛生組織（OIE）所認可的方法。而目前國內常使用檢測 NSP 的方法有美國 UBI（3B）、荷蘭 Ceditest（3ABC）、美國 Chekit（3ABC）等三種 ELISA 套組。本試驗即研發一套具準確及敏感性的測試方法，主要利用原核表現系統完成口蹄疫病毒非結構蛋白抗體 Sandwich ELISA 之建立，此方法將有潛力成為實驗室疾病診斷之工具。

貳、材料與方法

口蹄疫病毒非結構基因片段之增幅

以針對口蹄疫非結構性蛋白基因片段設計特異性引子，以 RT-PCR 增幅如預期長度約 525 bp 片段，完成 FMDV-NSP / pET 重組質體之構築。

轉形作用、重組蛋白質的誘導表現及純化

將重組質體轉形送到原核表現，培養並加入誘導劑 IPTG 連續誘導表現後，可溶性重組蛋白樣品以蛋白質膠電泳 SDS PAGE 分析確認與預期的分子量約 40 kDa 相符合。進而以親和性色層分析法量產純化重組蛋白，以偵測血清中 NSP 抗體。

重組蛋白質之功能性試驗

以西方墨點轉漬分析法證實功能性蛋白質與 O / TAW / 97 或 O / TAW / 99 抗血清之抗體反應。

單株抗體之製備

完成具有口蹄疫 NSP 功能區之單株抗體的製造與生產，以應用於 Sandwich ELISA 之抗體檢測分析。

Sandwich ELISA 與口蹄疫 NSP 抗體 ELISA 套組之比較

1. Sandwich ELISA 方法確效評估：從 770 支完成 Sandwich ELISA 試驗結果，以 96 孔測試盤完成測試，而每盤中以雙孔測試陽性對照血清組、陰性對照血清組、Blank 以及所有待測樣品。
2. 32 頭豬隻經口蹄疫病毒攻毒後，於 0、2、4、6、8、10、14、21、28、34 天分別收集 320 支血清樣品，以 Sandwich ELISA 及三種 NSP ELISA 套組進行比較分析，且評估敏感性結果。
3. 30 支試驗攻毒已知陽性血清樣品，供作 Sandwich ELISA 及三種 NSP ELISA 套組進行敏感性分析。
4. 96 支無特定病原豬血清樣品，以 Sandwich ELISA 及三種 NSP ELISA 套組進行特異性分析。
5. 159 支為 1997 年口蹄疫爆發前所收集之豬血清樣品，以 Sandwich ELISA 及三種 NSP ELISA 套組進行特異性分析。
6. 165 支疫苗接種之豬血清樣品，以 Sandwich ELISA 及三種 NSP ELISA 套組進行特異性分析。

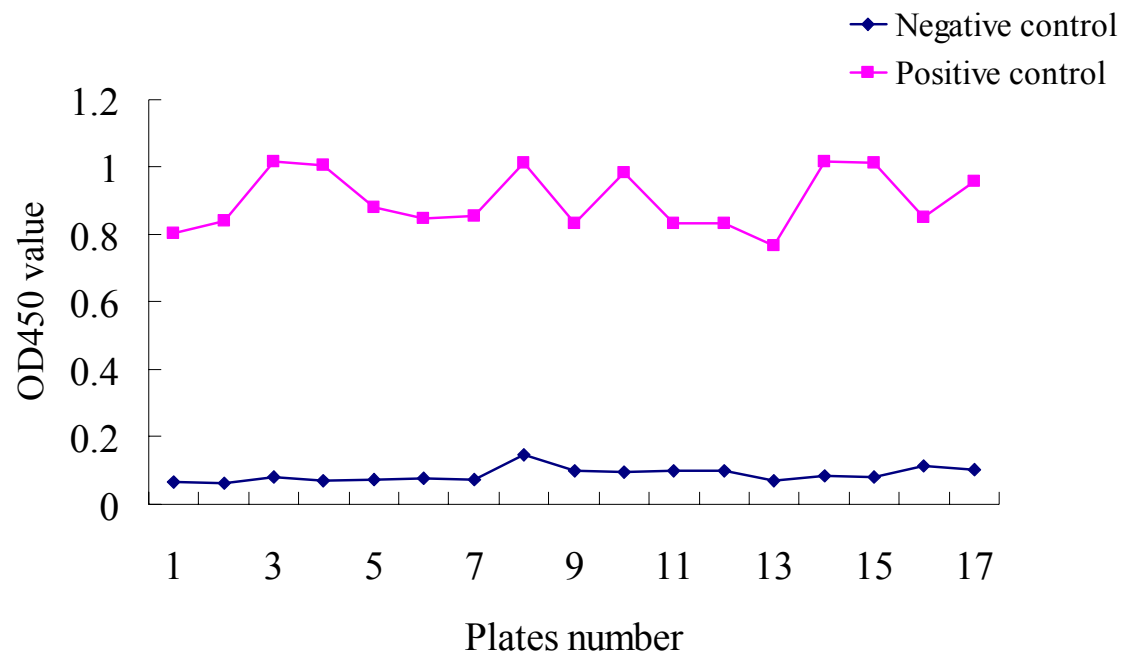
豬水疱病標準抗血清

六支購自英國 Pirbright 動物衛生研究所口蹄疫參考實驗室之豬水疱病標準抗血清，以 Sandwich ELISA 方法證明是否會與口蹄疫抗原產生非特異性反應。

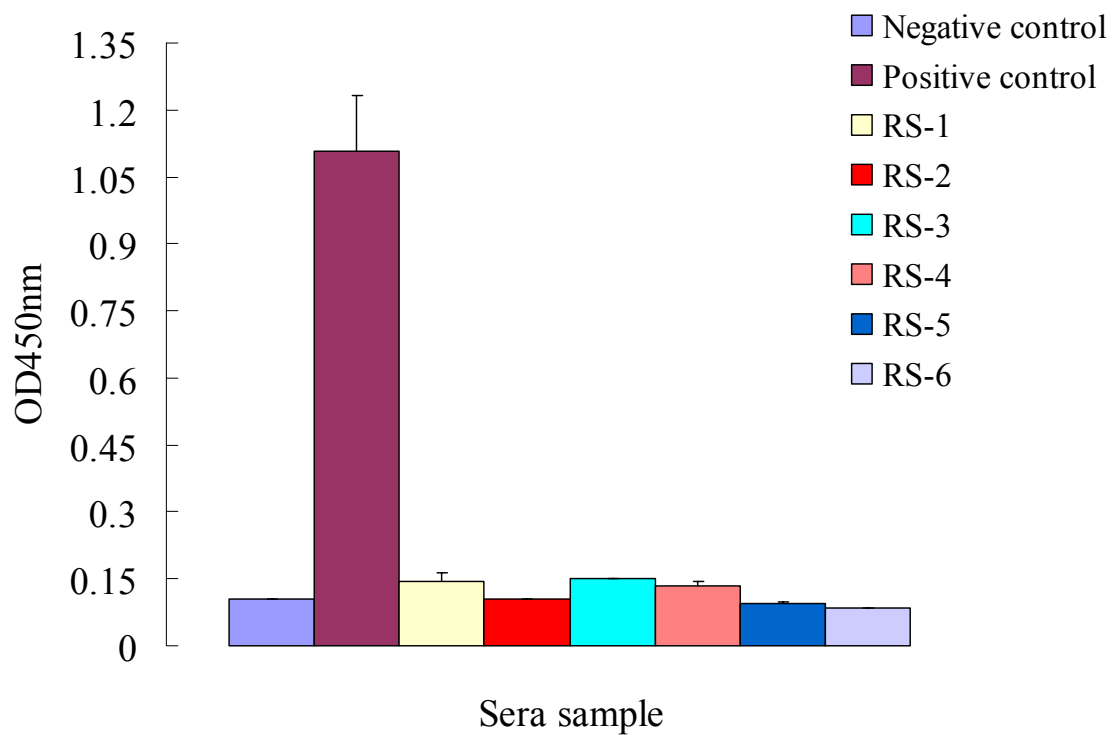
參、結果與討論

於 770 支各種不同來源之豬血清樣品找出最適標準化結果，陽性對照血清組及陰性對照血清組結果顯示統計平均 OD_{450 nm} 值分別為約 0.90 ± 0.09 及 0.09 ± 0.02 (圖一)，且從陽性試驗樣品及陰性試驗樣品最後確定臨界值 (cut off value) 約於 OD_{450 nm} 值 0.22，表示即 $OD \geq 0.22$ 為陽性； $OD \leq 0.17$ 為陰性；若 OD 為 0.18~0.21 時表示為疑陽性結果，須觀察畜場流行病學狀態或以其他試驗方法進一步評估與分析。由 Sandwich ELISA 確效結果證實診斷敏感性可達 98.4%，而診斷特異性可達 97~100 %。經試驗比較後發現本 Sandwich ELISA 法之診斷敏感性比 *Escherichia coli* 製成的商品化試劑套組 (35.5 %) 為高，且與其中表現極優的商品化試劑套組比較分析後發現一致性頗高 Kappa 統計值為 0.94。

另經試驗證實本方法可同時檢測口蹄疫 O、A、C、Asia 1、SAT1、SAT2、SAT3 等七種血清型別，且不會與豬水疱病抗血清產生非特異性反應(圖二)。



圖一、Sandwich ELISA 法之陽性及陰性對照組分析。



圖二、口蹄疫 Sandwich ELISA 對豬水疱病之特異性反應。結果依序顯示 column 1 為口蹄疫陰性對照血清組、column 2 為口蹄疫陽性對照血清組、RS-1 表示豬水疱病陰性抗血清、RS-2 表示豬水疱病強陽性抗血清、RS-3、RS-4、RS-5 及 RS-6 為豬水疱病弱陽性抗血清。