

口蹄疫病毒抗原 ELISA、病毒分離及 RT-PCR 敏感性之比較

報告人：黃郁琇 助理研究員（豬瘟研究組）

壹、緒言

口蹄疫(Foot and mouth disease; FMD)是一種急性偶蹄類動物傳染病，會造成嚴重之經濟損失。口蹄疫病毒(FMDV)是屬於正股單鏈 RNA 病毒，歸類於小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)、口瘡病毒屬(Aphthovirus)。FMDV 共有 O、A、C、Asia 1、SAT 1、SAT 2、SAT 3 等七種血清型，各血清型病毒間無交叉免疫保護作用。而口蹄疫的實驗室診斷以抗原鑑定為主，目前本所使用的口蹄疫抗原鑑定方法包括病毒分離(Virus isolation)、抗原-酵素結合免疫吸附試驗(antigen enzyme-linked immunosorbent assay; Antigen-ELISA)、反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)等。病毒分離是根據世界動物衛生組織(O.I.E)出版的「陸生動物的診斷測試及疫苗手冊」中口蹄疫的抗原診斷方法進行，以單層 BHK21 及 EBK 等株化細胞分離試材中的口蹄疫病毒。而抗原-酵素結合免疫吸附試驗則是利用抗原抗體間專一性鍵結的特性，檢測所稀釋試材中的口蹄疫病毒抗原，且鑑定其血清型別。反轉錄聚合酶連鎖反應是利用一對方向相反的寡核苷酸引子，先利用反轉錄酶將待測 RNA 轉錄成 cDNA，再經由 DNA 聚合酶的作用，反覆進行變性作用、煉合作用及延展作用等三步驟，而將特定的 DNA 片段大量複製，從而提升檢測病毒核酸之敏感性達百萬倍之多。由於口蹄疫疫情的控制，首重快速而準確的診斷。本所目前使用的三種口蹄疫診斷技術均是世界動物衛生組織(O.I.E)出版的「陸生動物的診斷測試及疫苗手冊」中所列舉之檢測方法，但是該手冊中並未針對其敏感性詳加描述，然而，在初步的診斷結果中，敏感性與診斷的準確度相關，若敏感性太低，將造成假陰性的診斷結果。因此，為了解此三種口蹄疫診斷技術之敏感性，乃進行此一實驗。

貳、材料與方法

本實驗，我們選擇一株源自細胞培養的口蹄疫病毒及一株口蹄疫病毒感染的水疱上皮組織 10 倍乳劑，分別以含 2%胎牛血清之細胞培養液，進行 10 倍連續稀釋至 10^{-8} ，再分別進行病毒力價回歸試驗、病毒分離、抗原-酵素結合免疫吸附試驗及反轉錄聚合酶連鎖反應等檢測。

一、病毒力價回歸試驗

將各稀釋階之病毒及 BHK 21 株化細胞同時加入 96 孔平底細胞培養盤，置於 37°C 含 5% CO_2 之細胞培養箱中培養兩天，再以顯微鏡觀察細胞病變作用(CPE)產生情形，紀錄各稀釋階病毒所產生之 CPE 數目，再依據 Reed 及 Muench 方法，計算病毒力價。

二、病毒分離

將各稀釋階病毒分別接種至 BHK 21 及 EBK 等株化細胞，先置於培養箱中感作一小時，以磷酸緩衝液(PBS)清洗後加入細胞培養液，置於 37°C 含 5% CO₂ 之細胞培養箱中培養，逐日觀察有無細胞病變作用(CPE)產生。

三、抗原-酵素結合免疫吸附試驗

首先將具有專一性之抗體被覆 (coating) 於 96 孔免疫反應盤上，再分別加入各稀釋階之病毒，使病毒抗原與免疫反應盤上的抗體進行專一性鍵結，反應後經以 PBS 清洗六次，再加入另一種對病毒抗原專一鍵結之檢測抗體，與待測抗原進行鍵結。之後加入帶有酵素之結合體抗體，與檢測抗體鍵結，最後加入酵素受質使之呈色，以肉眼初判其呈色結果後，再以 ELISA 判讀機讀取反應之吸光值。當待測試材的平均吸光值減去空白對照組的平均吸光值大於 0.1，即表示待測試材為口蹄疫抗原陽性。

四、反轉錄聚合酶連鎖反應

取 0.2ml 各稀釋階病毒分別置入微量管中，加入 Trizol 核糖核酸(RNA)萃取試劑，依據試劑的操作說明進行 RNA 核酸萃取。核酸再依據 Vangrysperre 等 1996 年發表之方法進行 RT-PCR 檢測，反應產物以洋菜凝膠進行電泳分析，再以 UV 燈照射檢視結果，並拍取照片。

參、結果與討論

病毒力價回歸試驗結果，計算後細胞培養口蹄疫病毒其病毒力價為 $10^{4.89}$ TCID₅₀/0.05ml，組織 10 倍乳劑之病毒力價為 $10^{4.67}$ TCID₅₀/0.05ml；在病毒分離部份，以 EBK 細胞進行病毒分離，在 10^{-5} 稀釋階仍出現 CPE 陽性，且最早可在感染後 12 小時即可觀察到 CPE (表一)；而以 BHK 21 細胞進行病毒分離時，只能檢測到 10^{-4} 稀釋階，並且在感染後 24 小時才觀察到 CPE (表二)；另 Antigen-ELISA 方法所檢測之吸光值，經計算後，最高僅能檢測至 10^{-1} 稀釋階 (表三)，意即 Antigen-ELISA 方法能檢測之力價，在細胞培養口蹄疫病毒之力價為 $10^{3.89}$ TCID₅₀/0.05ml，在組織 10 倍乳劑之力價為 $10^{4.67}$ TCID₅₀/0.05ml；而在 RT-PCR 方法中，不論是以 Trizol 或 Qiagen 之商品化核酸萃取套組進行病毒核酸萃取，均可檢測至 10^{-6} (圖一與圖二)。由此結果顯示，本所目前使用的三種口蹄疫診斷技術中，以 RT-PCR 的方法最敏感，其次是病毒分離，而以 Antigen-ELISA 最不敏感。

表一、EBK 細胞病毒分離結果

	-2	-3	-4	-5	-6	C
12hrs	+	+	-	-	-	-
24hrs	+	+	+	+	-	-
36hrs	+	+	+	+	-	-
48hrs	+	+	+	+	-	-

C：表示細胞對照組；+：表示 CPE 陽性；-：表示 CPE 陰性。

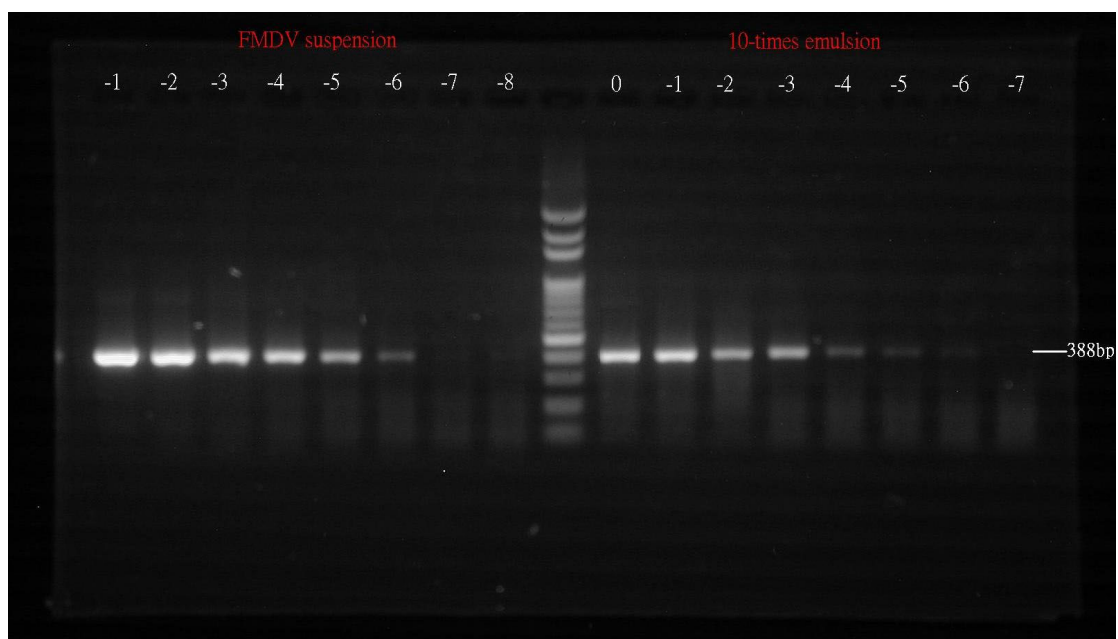
表二、BHK-21 細胞病毒分離結果

	-2	-3	-4	-5	-6	C
12hrs	-	-	-	-	-	-
24hrs	+	+	+	-	-	-
36hrs	+	+	+	-	-	-
48hrs	+	+	+	-	-	-

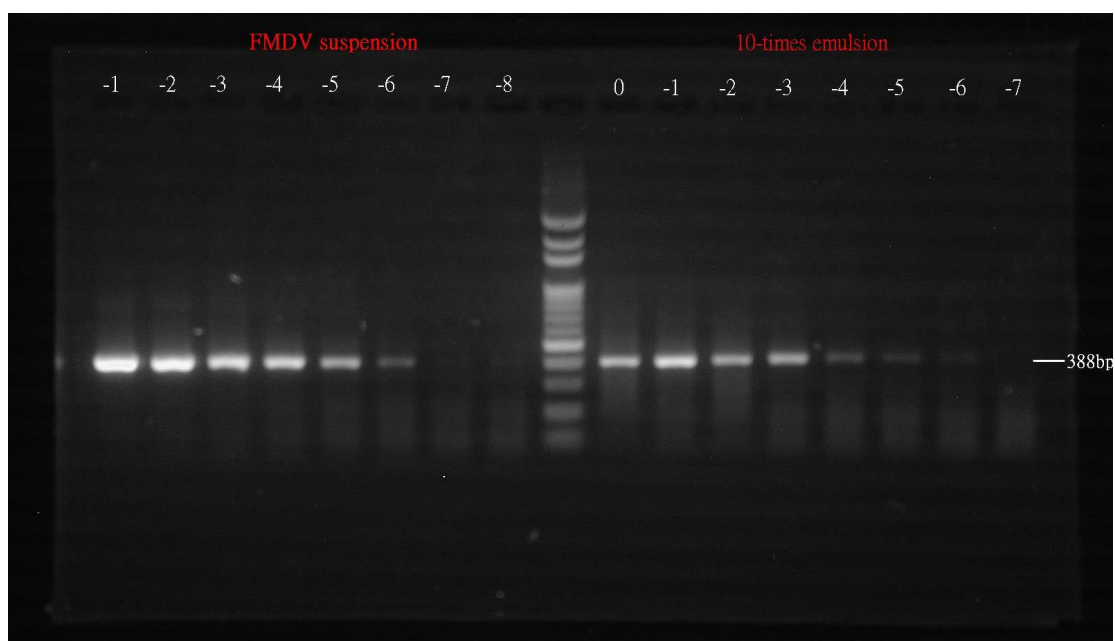
C：表示細胞對照組；+：表示 CPE 陽性；-：表示 CPE 陰性。

表三、口蹄疫病毒及組織 10 倍乳劑以 Antigen-ELISA 檢測之判讀吸光值

稀釋倍數	口蹄疫病毒	組織 10 倍乳劑
原液		
10^{-1}	0.2975	0.0975
10^{-2}	0.0425	0.029
10^{-3}	0.0225	0.0105
10^{-4}	-0.0002	0.012
10^{-5}	0.0002	0.0075
10^{-6}	0.0006	-0.0055
10^{-7}	0.0105	0.0055
10^{-8}	0.018	0.007



圖一、RT-PCR 檢測結果（以 Qiagen 之商品化核酸萃取套組萃取病毒核酸）。



圖二、RT-PCR 檢測結果（以 Trizol 試劑萃取病毒核酸）。