

山羊類鼻疽抗體 ELISA 檢測試劑之研發及評估

報告人：張惟茗 副研究員（生物研究組）

壹、緒言

台灣散發性類鼻疽之病人件數逐年增加，2001 年至 2004 年間，台灣地區共通報 57 件病例，其中 35 例為確定病例，且均屬偶發個案。這些確定的類鼻疽病例大都分佈在南台灣，其中又以高雄縣市、屏東縣、台南縣等居多(行政院衛生署暨疾病管制局)。一項針對台灣健康成人之血清檢測，發現類鼻疽抗體陽性率為 2.8 ~ 5 % (Chen, 2004)。研究指出於台南二仁溪北岸的耕植土，可大量分離出 *B. pseudomallei*，含量約該分離地的 $1.5-2.6 \times 10^3$ CFU/g、佔土壤總細菌數之 0.02 – 0.13%，這地區居民抗體陽性率為 36.6%、21.6%、及 10.9%，顯示台灣地區是發生類鼻疽的潛在危險區域 (Su, 2007)。病原分離為本病確診的唯一方法，但有一些輔助方法包括免疫螢光、ELISA 或 PCR 等被發展以縮短病原鑑定時間，但大部份沒有經過大量田間測試。目前本病並無商品化抗體檢測試劑可供利用，因此為檢測動物血清中之類鼻疽抗體，本實驗嘗試應用酵素連結免疫吸附試驗方法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 於動物抗體之檢測。

貳、材料與方法

本實驗首先利用實驗兔製備陽性血清，另由於類鼻疽之發生有緯度限制之特性，乃收集中北部山羊血清作為陰性對照，其中包括民國 78 年間採集於台北縣 200 支及台中縣 100 支山羊血清，共 300 支。兔高度免疫抗血清之製備係將 *Burkholderia pseudomallei* 培養及不活化後取至少約 10^{10} CFU 與等量 liquid paraffin 自製油質佐劑充分混合後，肌肉注射免疫 12 週齡兔子。經各間隔一週之 3 次補強免疫後，抽血以平板凝集試驗檢測抗體力價，待抗血清與免疫抗原出現明顯凝集反應時，再放血分離兔血清。ELISA 抗原之標準化係利用兔高度免疫抗血清、兔陰性血清與抗原分別稀釋成不同稀釋倍數進行 “box titration”，以調整抗原及測試血清之最適濃度。ELISA 之進行，先以 96 孔微量滴定盤每一小孔加入 100 μ L 的補體結合試驗抗原(溶於 coating buffer) 密封置於 4°C 一夜。隔夜後加入 100 μ L 的填塞液，37°C 置放 2 小時，再以清洗液沖洗 3 次後即可加入抗體反應。測試抗體之反應過程如下：在 96 孔微量滴定盤孔分別加入 100 μ L 以清洗液稀釋 100 倍之測試血清檢體。在 37°C 下作用 1 小時後，以 100 μ L 清洗液沖洗 3 次後，再加入 100 μ L 稀釋 1,000 倍之兔抗山羊過氧化氫 標示抗體(Jackson) 在 37°C 下作用 1 小時反應。反應後，以 100 μ L 稀釋液再沖洗 3 次後，再加入 100 μ L 含 0.1% O-phenylenediamine (OPD) 及 0.03% 過氧化氫檸檬酸液呈色。室溫暗室呈色 15 分鐘後，以 96 孔微量滴定盤吸光儀測試(波長 450nm)。結果判定是依據 300 個陰性對照組血清吸光度之平均值加上 2 倍標準偏差值當作篩選值。凡樣品吸光度大於

篩選值者判為陽性，小或等於篩選值者判為陰性。所有樣品均為重覆測試二次，結果一致後判定。ELISA 試驗結果再與類鼻疽補體結合試驗(complement fixation test, CF) 結果進行比較。

參、結果與討論

在各種血清學抗體檢測方法中，間接血球凝集試驗 (IHA)是最被廣泛應用，雖然它的敏感性及特異性不佳。在地方流性地區如泰國，IHA 在不同人類族群中血清背景陽性值可能高達 30 至 47 %，可能因為重覆接觸環境中的 BP 或 *B. thailandensis* (抗原性接近但無病原性)所致 (Khupulsup, 1986)。比起東南亞，澳洲的血清背景陽性值較低 (Ashdown, 1986)，這也反應在較低的 IHA 篩選值，澳洲篩選值為 1:40 而泰國為 1:160 (Leelarasamee, 1985; Naigowit, 1989)。但也因不同的抗原製備及不同的篩選值 (從 1:10 至 1:160)，不同地區的 IHA 檢測結果很難互相比較。針對 7 個病人作為期 1 至 6 年的長期抗體調查發現不管是 IgM、IgG 或 IgA，病人抗體的升、降或持續均無法預測其規律 (Wuthiekanun, 2004)。補體結合試驗很早就被應用在類鼻疽的抗體檢測 (Nigg, 1961)。在鼻疽 (*Burkholderia mallei*) 的檢測上，CF 與 ELISA 同被 OIE 列為標準方法。但是 CF 因為檢驗試材取得、標準化、時間及操作技巧等因素，導致實驗室操作難度較高。當有大量檢體需檢驗時，CF 在實務上就很難應付了。因此，本實驗室同時研發 ELISA，可作先期大量篩檢用。當有 ELISA 陽性檢體檢出時，再利用 CF 測定力價。關於本病，台灣本地動物沒有報告病例發生或流行病學調查資料，也沒有標準陽性及陰性血清的收集，而這也造成在建立血清診斷方法時效果評估的困難。由於 BP 適合於熱帶地區生長，超過南、北緯 20 度以上的地方，就不易見到它的蹤跡。因此，保存於本所 78 年中台灣及北台灣採集的 300 個山羊血清被當為陰性標準血清，以測試 CF 及 ELISA 之特異性及建立陰性標準值。CF 及 ELISA 的檢測結果，所有 300 個陰性山羊血清也確實均為陰性。實驗室人工免疫血清血清檢測結果，CF 及 ELISA 檢測後均為陽性。因此，本實驗室所建立之 ELISA 應可用於本病之血清學檢測，但確實的特異性及敏感性評估，則有待收集更多的陽性及陰性血清納入測試，以資周全。