

水疱性口炎 ELISA 抗體檢測方法之建立

陳姿菡*、潘居祥、李璠、林有良、王明隆、石佳霓、于維玲、黃天祥、蔡向榮

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 水疱性口炎 (VS) 之臨床症狀與口蹄疫 (FMD) 及豬水疱病 (SVD) 等頗為相似，常造成臨床診斷上難以有效地區別。試驗依據世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties ; OIE) 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals) 建立 VS 病毒 (VSV) 競爭型 (Competitive) 及間接型 (Indirect) ELISA 抗體檢測方法。試驗主要係針對 VS 之新澤西型 (New Jersey ; VSV-NJ) 及印第安納型 (Indiana ; VSV-IND) 二種血清型病毒基因組上具有特徵性的病毒表面蛋白如核衣殼蛋白 (Nucleocapsid protein) 及醣蛋白 (Glycoprotein) 等高度免疫原性之抗原決定位進行分析。在試驗過程中建立具功能性之重組蛋白抗原，開發一套製程穩定且操作標準化之簡便、安定、敏感、特異性及兼具安全性之快速檢驗試劑方法，結果顯示分析敏感性可達 10^{30} 倍、診斷敏感性為 94% 及診斷特異性可達 90%，且不會與口蹄疫抗血清產生非特異性反應，將可應用於牛及馬血清樣品之抗體檢測，以建立臨床水泡性疾病之血清學區別診斷方法。

關鍵字：水疱性口炎、抗體檢測、反轉錄聚合酶鏈反應、酵素連結免疫吸附法。

緒言

水疱性口炎 (Vesicular stomatitis ; VS) 是馬、牛、豬的水疱性疾病，屬於棒狀病毒科 (Rhabdoviridae) 的水泡病毒屬 (Vesiculovirus)，為 11kb 陰性單股直線 RNA 基因組，含有聚合酶 (Polymerase ; L)、醣蛋白 (Glycoprotein ; GP)、核衣殼蛋白 (Nucleocapsid ; N)、磷酸蛋白 Phosphoprotein ; P) 及基質蛋白 (Matrix protein ; M) 等五個病毒蛋白質。其中以表面 GP 及 N 最具高度免疫原性 [4,10,15,19]。臨床上水疱性口炎與口蹄疫 (Foot and mouth disease ; FMD) 及豬水疱病 (Swine vesicular disease ; SVD) 難以區別。對水疱性口炎病毒具有感受性的動物包括馬、豬及牛，而口蹄疫病毒可感染反芻獸 (牛、綿羊、山羊) 及豬，豬水疱病病毒只能感染豬，由於三種疾病的臨床症狀相似，因此確實且立即的區別診斷相當重要。

水疱性口炎主要是直接經由皮膚或黏膜而感染，亦可自沙蠅 (sandfly) 及蚊子體內分離出來，因此推測水疱性口炎可經由昆蟲傳播，而季節的變換會影響本病之發生率。水疱性口炎常於熱帶地區雨季結束時或溫暖地區第一次降霜時節發生。此病的致病機序目前仍不清楚，且特異性的抗體亦無法預防水疱性口炎病毒 (VSV) 之感染。

水疱性口炎病毒在免疫學上主要分為兩種血清型，棒狀病毒科的新澤西型 (New Jersey ; VSV-NJ) 及印第安納型 (Indiana ; VSV-IND)，新澤西型以引起牲畜疾病為主，造成較嚴重的臨床症狀，潛伏期比印第安納型短。過去數十年來，許多其他相近的棒狀病毒已相繼自病畜身上分離出來，其中 Salto-Argentina/63 株及 Alagoas-Brazil/64 株最具代表性，分別被歸為印第安納型的 IND-2 及 IND-3 亞型。依據 OIE 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊中所

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

載，抗原鑑定方法有英國動物衛生研究所 (Institute for Animal Health, Pirbright, UK) 研發的間接三明治式酵素結合免疫吸附試驗診斷試劑 (Indirect sandwich ELISA ; IS-ELISA)，可區別水疱性口炎及其他水疱性疾病，並鑑定病毒亞型；步驟中需用一組以四種亞型病毒株 (IND-1、IND-2、IND-3、NJ) 製造出來的兔抗血清 (Rabbit antisera)，故可檢測水疱性口炎病毒的四種亞型。

其他檢測方法有病毒分離、RT-PCR 及血清學 [15] 等。血清學檢測方法含病毒中和試驗 (Virus neutralization test ; VNT)、ELISA (包括液相阻斷型酵素連結免疫吸附法 (Liquid-phase blocking ELISA ; LP-ELISA)) [2,3,10,11,12,16,17] 與競爭型 ELISA (Competition ELISA ; C-ELISA) [1,13,14]、補體結合反應 (Complement fixation ; CF)、凝膠免疫擴散反應 (Agar gel immunodiffusion)、免疫電泳法 (Counter immunoelectrophoresis) 等，常被用來檢測血清中 VSV 抗體，其中 LP-ELISA 及 VNT 以評估確認及定量血清特異性抗體，而 CF 試驗可用於早期抗體之定量 [20]。另有 RT-PCR、DIG-ELISA、Lateral flow devices 應用在臨床中檢測 VSV 抗原的方法 [4,6,7,8,18]。

自報告顯示 LP-ELISA 可用於檢測水疱性口炎及定量 VSV 引起的抗體，推薦以病毒 GP 為抗原，其優點為不具傳染性，可檢測中和抗體量，同時偽陽性結果也較 VNT 少。C-ELISA 以檢測抗體，有學者提出以 VSV-NJ 及 VSV-IND-1 型重組抗原作為抗原的應用。VNT 使用的血清樣品需先以 56°C 水浴非動化 30 分鐘，而 VSV-NJ 或 VSV-IND 的感染劑量為 100 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)，使用的細胞為已形成單層的培養細胞或懸浮培養的 IB-RS-2 細胞，以細胞病變效應 (Cytopathic effect ; CPE) 檢測未被中和之病毒，此方法步驟較繁複且費時。近幾年的研究報告顯示以 IND 所製成檢測牛及馬抗體的 Mab-linked indirect ELISA (MLI-ELISA) 及 Mab-linked competitive ELISA (MLC-ELISA)，二者的敏感性可達 80% 及 95%，而特異性可達 97% 及 99%，且可與感染 NJ 的馬血清產生交叉反應 [15]。另有報告

指出以 NJ 及 GP 所製成的 Blocking ELISA，找出試驗之臨界點在 PI 為 40% 相當於 SNT 力價 32 倍，此方法與 SNT 的相關性比 VSV-NJ ELISA 還高，其特異性為 99%。這些方法皆證實不會與口蹄疫及豬水疱病及 VSV-IND 產生非特異性反應 [16]。此外，有報告以 1,106 支乳牛血清進行 VNT 與 C-ELISA 分析 VSV-N 與 VSV-IND 抗體檢測的比較，結果顯示 Kappa 值為 88.71%，具有良好的一致性 [5]。還有研發利用 IgM-capture ELISA 分析樣品，結果發現抗體最早可於感染後 4-5 天 (Days post-infection ; DPI) 檢出，且持續至 35 DPI，而 SNT 檢測的 IgM 抗體最早出現於 5 DPI，而中和抗體的檢出最晚可至 160 DPI，C-ELISA 的抗體檢出最早於第 6-7 DPI，且持續至 160 DPI，證實這樣的試劑可檢測感染 VSV 的馬及豬之 IgM 抗體 [21]。

故本試驗將依據世界衛生動物組織 (Office International Des Epizooties ; OIE) 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals) [20]，建立 ELISA 抗體檢測方法，並配合要求試驗診斷技術須符合一致化和標準化。

材料與方法

基因合成及設計特異性引子及使用 RT-PCR 方法增幅核酸產物之鑑定

根據 Gene bank 搜尋位於 VSV-NJ (Accession: AF067845) 及 VSV-IND (Accession: FJ478454) 封套的表面 GP 及 N 最具高度免疫抗原性核酸序列，進行基因合成及質體之構築，另設計特異性引子以 RT-PCR 方法增幅 GP 及 N 基因片段之鑑定。

血清樣品

購自美國 National Veterinary Services Laboratories (NVSL) 30 支 VSV 牛及馬陽性及陰性標準血清。另購自英國 Pirbright 口蹄疫參考實驗室 7 支口蹄疫病毒 (FMDV) (血清型 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3) 等抗血清。

量產 VSV-NJ 及 VSV-IND 之 N 重組蛋白之誘導表現及純化

建構 VSV-NJ 及 VSV-IND 封套的表面 GP 及 N 最具高度免疫原性的重組質體 (pCold TF)，並經轉形作用至 BL21DE3 菌株以選殖最佳表現的重組蛋白，於蛋白質電泳膠分析 (SDS-PAGE assay) 確認蛋白質分子量之大小及量產，藉低壓色層分析儀 (Low-pressure liquid chromatography; LPLC) 進行親和性色層分析 (Ni-NTA) 與純化，以獲得具有功能性的重組蛋白質。

重組蛋白質之功能性試驗

為了確認重組蛋白質的功能性反應，首先以 SDS PAGE 確認分子量的大小，另分別以 2 倍系列稀釋至 100-12,800 倍，以間接型 ELISA 試驗分析重組蛋白質與陽性抗血清之抗原與抗體結合反應，而作連續稀釋血清之目的為了進一步測試理想化條件。接著利用分光光度儀建立標準蛋白 BSA 曲線，以計算表現重組蛋白質之濃度。

依據 OIE 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 2010 建立 VSV 競爭型 (Competition) 及間接型三明治 (Indirect sandwich) ELISA 抗體檢測方法

- 1.VSV 間接型 (Indirect) ELISA：經篩選後純化之重組蛋白 NJ-N ($2 \mu\text{g}/\text{well}$) 以 coating buffer (0.06 M carbonate/bicarbonate buffer, pH9.6) (KPL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 稀釋，放置於 4°C 隔夜或 37°C 1 小時感作，披覆於 96 孔微量抗原盤 (microplate)，待檢豬血清樣品中的抗體，經 37°C 1 小時感作後清洗，以 Goat anti - bovine IgG 或 Goat anti - horse IgG 的 HRP 鍵結反應，最後於 OD 450 nm 讀取數據之結果，作為間接型三明治 ELISA 抗體檢測方法之建立。
- 2.VSV 競爭型 (Competition) ELISA：將重組蛋白 NJ-N ($2 \mu\text{g}/\text{well}$) 以 coating buffer (0.06 M carbonate/bicarbonate buffer, pH9.6) (KPL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 稀釋，放置於 4°C 隔夜或 37°C 1 小時，披覆於 96 孔抗原盤，以待檢樣品中的抗體及加入含有牛或馬等多株抗體鍵結

HRP 以進行相互競爭試驗，最後依據公式計算 Percentage inhibition (PI, %) = $\{1 - (\text{OD } 450 \text{ nm test well} / \text{OD } 450 \text{ nm control well})\} \times 100 \%$ ，所獲得的結果作為發展競爭型 ELISA 抗體檢測方法的分析[13]。

水疱性口炎病毒 NJ 或 IND 血清型抗體最適化條件之建立

以 VSV 陽性血清樣品，建立重組蛋白與牛或馬源抗血清之抗體檢測最適化條件的分析。

完成牛及馬標準血清之抗體檢測及 VSV-NJ 競爭型 ELISA 之診斷特異性及敏感性分析

以 VSV 陽性及陰性的血清樣品，比較抗體檢測的差異。以標準血清評估 VSV 競爭型 ELISA 之診斷特異性及敏感性試驗。

結果

設計特異性引子及使用 RT-PCR 方法增幅核酸產物

根據 Gene bank 所述有關 VSV 之核酸序列資料庫，利用 DNASTAR 軟體分析 VSV-NJ-N、VSV-IND-N 及 VSV-NJ-GP 之核酸序列資料庫，以了解重要的免疫決定位，進行基因合成及質體之構築。接著設計特異性引子，並利用 RT-PCR 方法增幅核酸產物，完成質體的構築選殖後鑑定嵌入序列的大小，經定序及限制酶切位確認與 Gene bank 所發表之圖譜嵌入無誤，作為建立抗體檢測方法的參考。

針對 VSV-NJ 及 VSV-IND strain 之 N 及 GP protein 等基因增幅之片段大小為 VSV-NJ-N 約 732 bp (244 a.a.)、VSV-IND-N 約 720 bp (240 a.a.) 及 VSV-NJ-GP 約 837 bp (279 a.a.) (圖 1)。

融合蛋白質的量產誘導表現及純化

將 RT-PCR 所獲得的產物構築於 pCold TF 表現質體 (圖 2)，經原核細胞誘導表現 VSV-NJ-N、VSV-IND-N 及 VSV-NJ-GP 等重組蛋白，於 SDS PAGE 分析結果分子量如預期大小分別約 76 kDa (圖 3)。

重組蛋白質之功能性試驗

以間接型 ELISA 試驗，經試驗結果顯示重組蛋白會與 VSV 陽性標準牛血清之多株抗體測試結果有陽性訊號反應，且最佳稀釋倍數於 200-600 倍之間 (圖 4)。

ELISA 抗原盤之最適化抗體定量條件之分析

針對純化之 VSV-NJ-N 及 VSV-IND-N 重組蛋白進行蛋白質濃度的測定，結果分別為 0.15、0.3 及 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，以 100-12,800 倍之 2 倍稀釋抗血清選擇重組蛋白的最適化濃度，結果顯示分析敏感性可達 $10^{-3.0}$ 倍，以發展抗體檢測的競爭型及間接型的 ELISA 方法 (圖 4)。

評估 VSV-NJ 及 VSV-IND ELISA 之抗體差異性分析

1. 以 NJ-N 的重組蛋白檢測牛及馬的 IND 及 NJ 抗體，在間接型 ELISA 試驗中，與含鍵結 HRP 的牛及馬二抗-IgG 進行結合，若樣品中含有 IND 及 NJ 抗體時，會與 NJ-N 重組蛋白結合，而呈現高 OD 值結果，所有陽性樣品的 OD 450 nm 範圍值為 $\geq 0.15\sim 2$ ，陰性樣品為 < 0.15 ，陽性與陰性之比例 P/N 值 > 3 倍以上 (圖 5 及圖 6)。因此，經陽性及陰性樣品的測試分析後臨界值 (Cutoff value) 判定為 OD 450 nm 值 ≥ 0.15 為陽性，OD 450 nm 值 < 0.15 為陰性結果。
2. 以 NJ-N 的重組蛋白檢測牛或馬的 NJ/IND 抗體，在競爭型的 ELISA 試驗中，待測血清樣品之陽性抗體會與含鍵結 HRP 的多株抗體進行競爭反應。若樣品中含有 NJ/IND 抗體時，會於試驗反應中與 NJ 重組蛋白結合，繼之所加入的二抗 HRP 就不會連結上去，因此檢測呈陽性結果者為無色或弱黃色反的低 OD 值，反之，若呈陰性結果者則呈高 OD 值的強黃色反應，經 PI (%) 公式換算的結果，陽性樣品的範圍為 $\geq 50\%\sim 90\%$ (OD 值 ≤ 0.22)，而陰性結果 PI 值為 $< 50\%$ (OD 值 > 0.22) (圖 7)。所以最後判定臨界值 (cutoff value) 之 PI 值 $\geq 50\%$ 以上為陽性，PI 值 $< 50\%$ 為陰性結果。

VSV-NJ-N 競爭型 ELISA 與 NJ-N indirect ELISA 之診斷特異性及敏感性分析

以競爭型 ELISA 與 indirect ELISA 檢測牛及馬標準血清抗體試驗的結果，顯示與重組蛋白之反應結果具有抗體之專一特異性，而以陰性樣品評估診斷特異性及陽性樣品評估診斷敏感性的結果分別為 90% 及 94%，Kappa 值為 0.84 (almost perfect agreement)，符合率 (Agreement) 為 0.93%。

討論

水疱性口炎 (Vesicular stomatitis; VS) 屬於重要動物傳染病，我國目前為非疫區，然世界各國視為國際貿易之重要病原，皆以撲殺及嚴格限制性畜移動來控制本病。根據 OIE 表 A 陸生動物衛生法典所載，血清抗體檢測是診斷本病的重要方法，亦是撲滅及疾病監測的重要工具。經報告顯示，診斷血清檢測的方法常出現偽陽性，造成判定上的困難。尤其近幾年，從英國、丹麥、加拿大及美國等國家進口輸入的豬隻數量逐年增加，且我國目前檢疫所執行之檢測方法仍局限口蹄疫及豬水疱病等項目，恐造成防疫檢疫執行監控網的疏漏及不健全。由於本病目前無 VSV 抗體檢測之商品化試劑套組，故依據世界動物衛生組織 (Office International Des Epizooties; OIE) 陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals) 建立 ELISA 抗體檢測方法，未來將與 OIE 之黃金標準方法如病毒中和試驗方法進行比較分析及進一步確效試驗，以建立早期發現立即摘除呈抗體陽性之牛、馬及豬等動物。

本試驗方法主要是針對 VSV 感染牛隻或馬匹之抗體進行檢測所建立之競爭型及間接型 ELISA 方法，由於應用開發原核表現系統可容易獲得高量產的可溶性重組蛋白質，且由基因表達量產之 VSV-NJ-N 重組蛋白具有安全性及敏感性的優點，而無含病毒所帶來潛在擴散病原的風險。經試驗結果顯示於競爭型 ELISA 及 Indirect ELISA 除了可檢測同源性 VSV-NJ-N 抗體之外，也可檢測異源性的 VSV-IND-N 抗體，表示所選擇的重組蛋白之檢測能力頗高，且不會與口蹄疫病毒 (FMDV) 之七種牛源血清型 (O、A、C、Asia 1、

SAT1、SAT2、SAT3) 之抗血清產生非特異性反應。與標準血清測試比較後，發現此二種方法之診斷敏感性可達 94%，而診斷特異性可達 90%。於定量檢測抗體的結果發現競爭型 ELISA 與間接型 ELISA 有部份正相關，其中有 2 個樣品仍存在有試驗的差異性 (圖 7)，符合率為 93%。然從動物品系之測試分析發現，本方法的競爭型 ELISA 可同時檢測牛及馬血清樣品，此與間接型 ELISA 偵測品系範圍之限制有所差異。

未來本研究團隊將會持續地擴增樣品數量，以穩定要求試驗品質及提升批次檢測之再現性。若有機會至國外參加學術交流，則可學習其他方法如病毒血清中和試驗或阻斷式 ELISA 方法，且進一步使用目前現有的血清樣品比對結果，以改良方法探討抗體力價的相關性。目前的結果雖只限於由購自國外的進口牛及

馬標準血清所建立的水疱性口炎抗體診斷方法，未來工作除了擴增血清樣品數及進一步建立本方法的確效試驗之外，另需再行研發建立豬隻使用的 VSV ELISA 抗體檢測方法，只是目前尚缺少豬源標準血清的比對，將來若有機會採購豬血清或與國外實驗室合作測試，才能適切地針對國內養豬場及國外進口豬隻進行樣品檢測，以了解田間豬體中是否同時感染豬水疱性疾病中的水疱性口炎，並將其應用於國外輸入動物的檢疫分析流程監控之一項新增檢驗方法才是我們的最終目標。總之，建立本方法以減少疫病對經濟動物之危害及降低疾病傳播爆發之風險，協助應用於臨床疾病之確診，並配合防疫體系以達到早期快速準確摘除潛伏感染動物的目標。

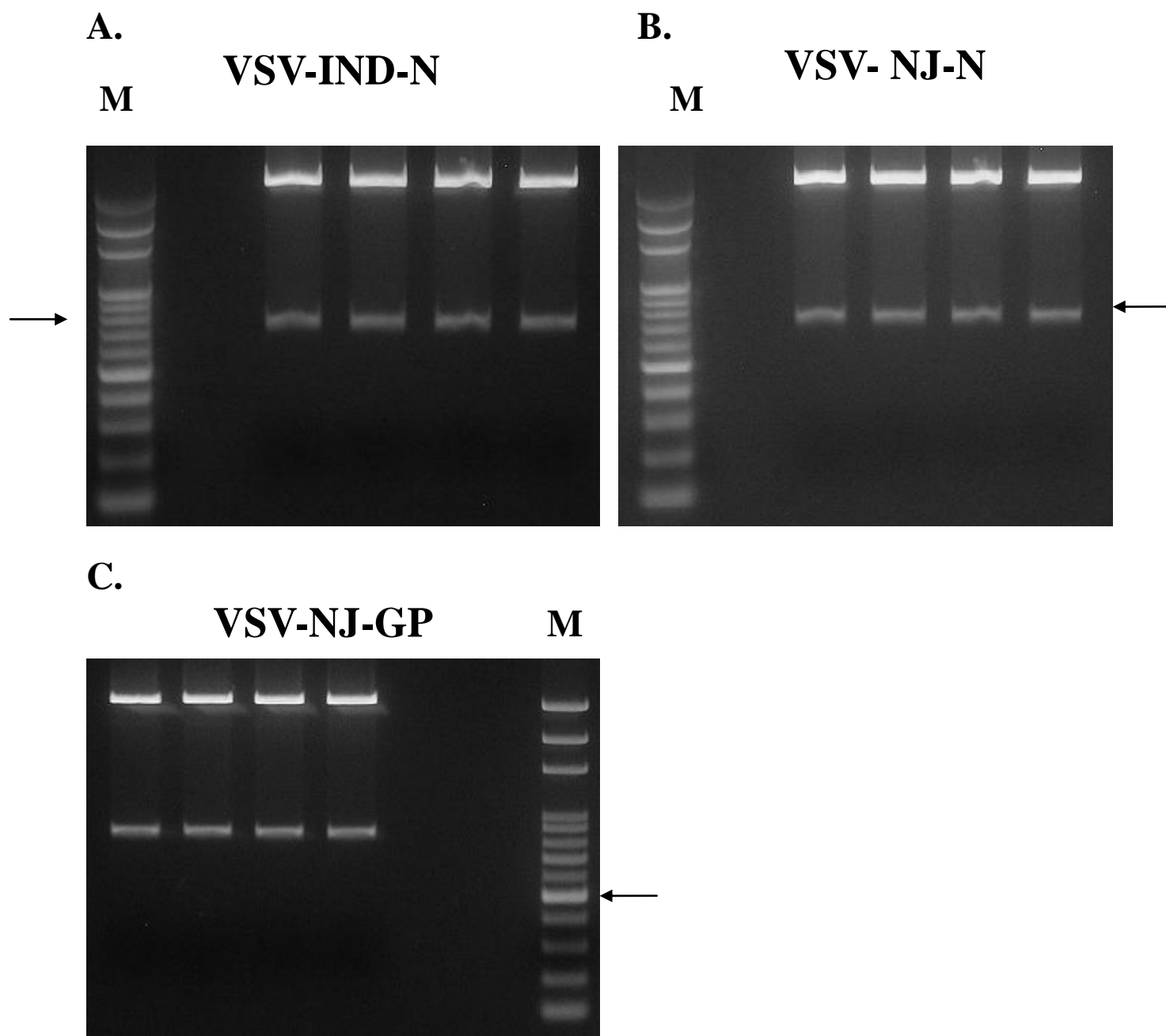


圖 1、以 RT-PCR 增幅水疱性口炎病毒新澤西型 (New Jersey ; VSV-NJ) 及印第安納型 (Indiana ; VSV-IND) 之核衣殼蛋白 (nucleocapsid, N) 及醣蛋白 (glycoprotein, GP) 基因核酸產物之鑑定。PCR 產物於 1 % agarose gel 上進行電泳分析並以 SYBR Safe™ 染色燈照觀察表現結果。依 100~1000 bp DNA 標示物 (Marker, M) 作為 DNA 片段比對，增幅之基因片段大小為 VSV-IND-N 約 720 bp (A)、VSV-NJ-N 約 732 bp (B) 及 VSV-NJ-GP 約 837 bp (C) (箭頭標示)。

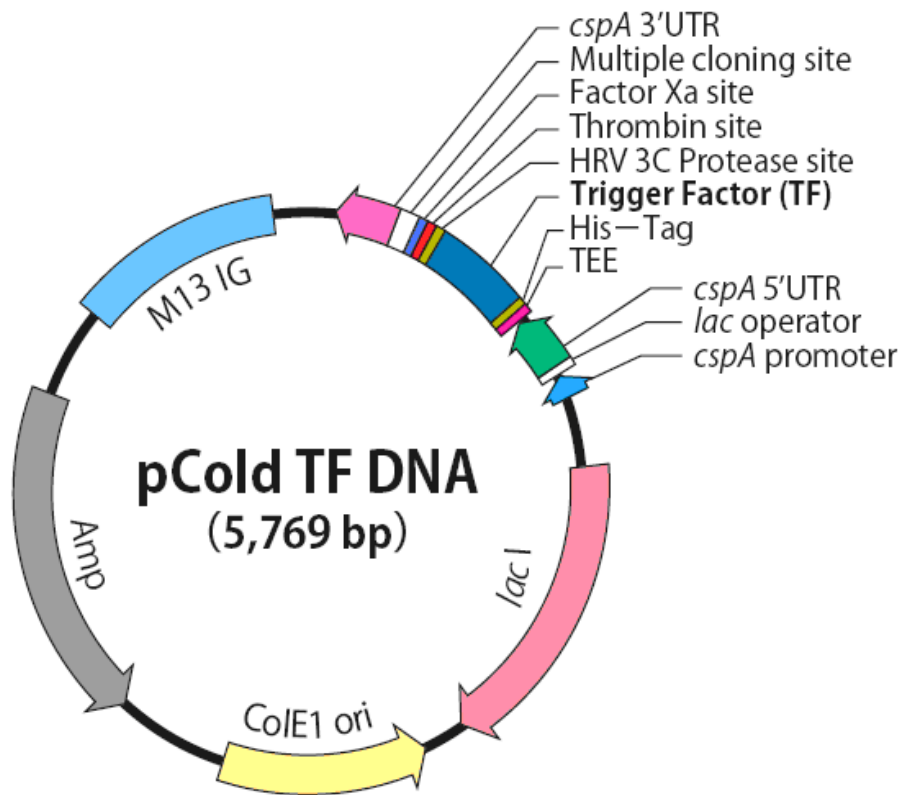


Fig.1 pCold TF DVA : Vector Map
GeneBank Accession No. AB213654

圖 2、pCold TF 表現質體之圖譜以構築表現 VSV-NJ/IND 的 N 及 GP 基因。

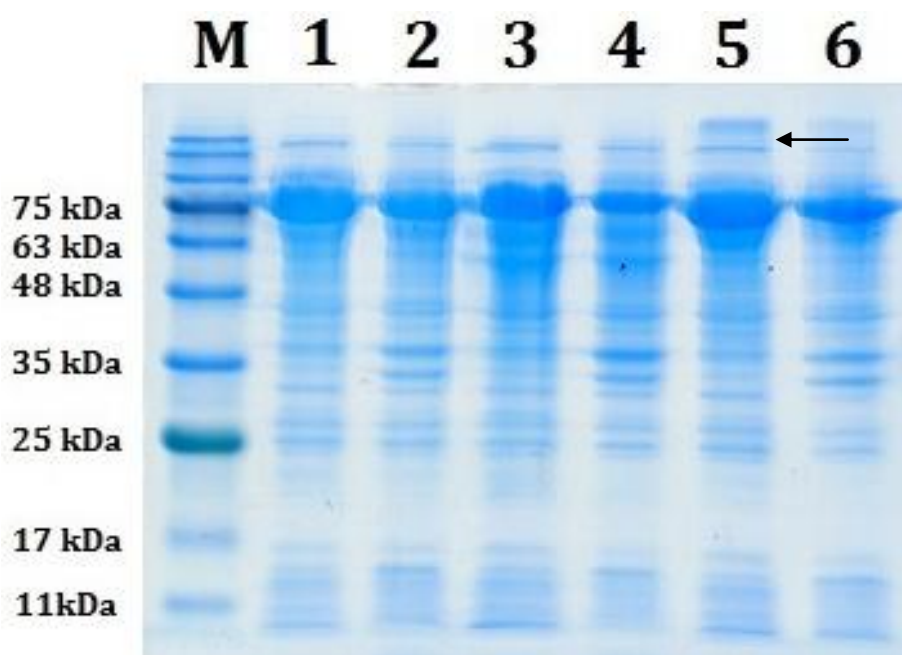


圖 3、以原核表現的水疱性口炎病毒 (VSV) 重組蛋白經 SDS - PAGE 及 Coomassie blue 染色的分析結果。以 pCold TF 原核系統表現含有 VSV - NJ/IND epitope 質體於 BL21 (DE3) 表現細胞經最後濃度 1mM IPTG 誘導產生皆約為 76 kDa 的 VSV-NJ-N (Lanes 1, 2) 及 VSV-IND-N (Lanes 3, 4) 及 VSV-NJ-GP (Lanes 5, 6) 等可溶性重組蛋白(箭頭標示), 其中 Lanes 1, 3, 5 皆為上清液 (Supernatants), Lanes 2, 4, 6 為沉澱物 (pellets), M 表示標準分子量單位為 Kilodaltons (kDa)。

水痘性口炎 ELISA 抗體檢測方法之建立

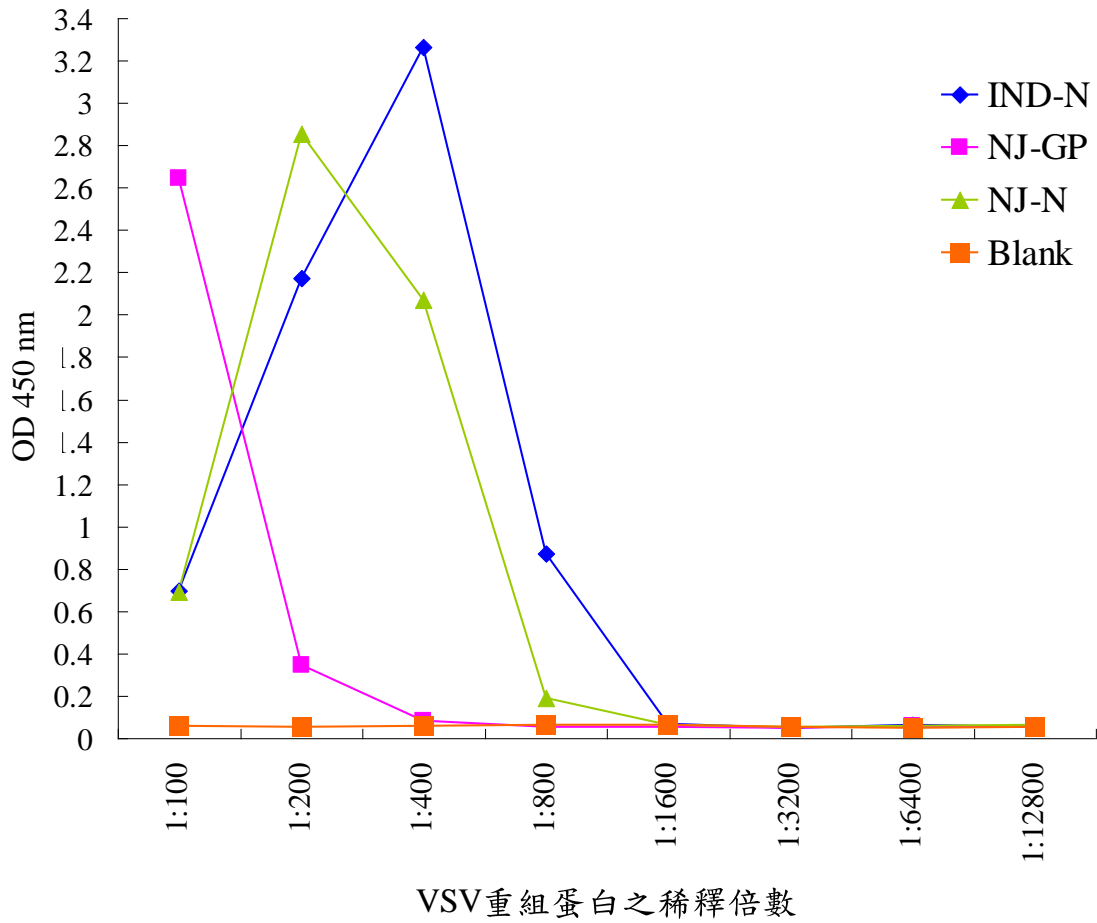
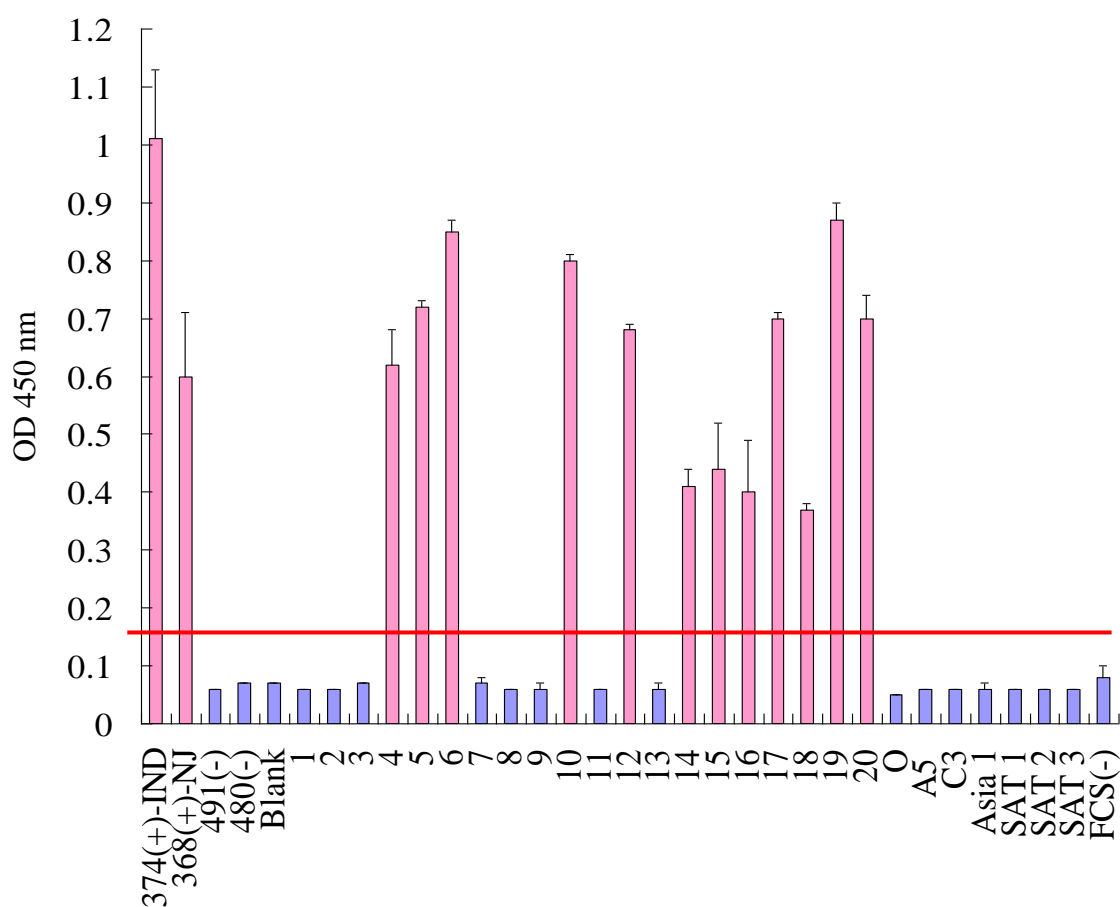
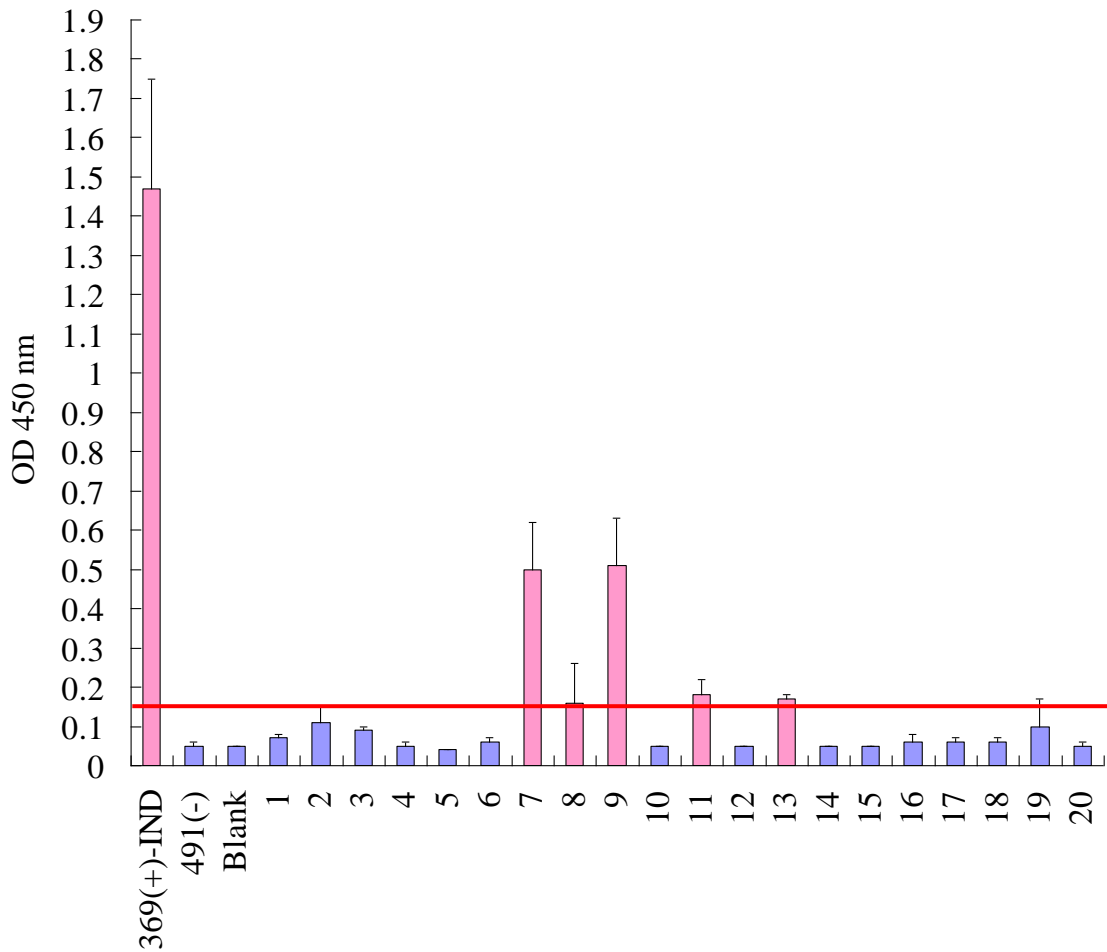


圖 4、由 pCold TF 質體表現並經純化的可溶性重組蛋白 (IND-N、NJ-GP、NJ-N)，分別以 100-12,800 倍完成 2 倍系列稀釋，藉由間接型 ELISA 找出最適化的抗原與抗體結合條件。



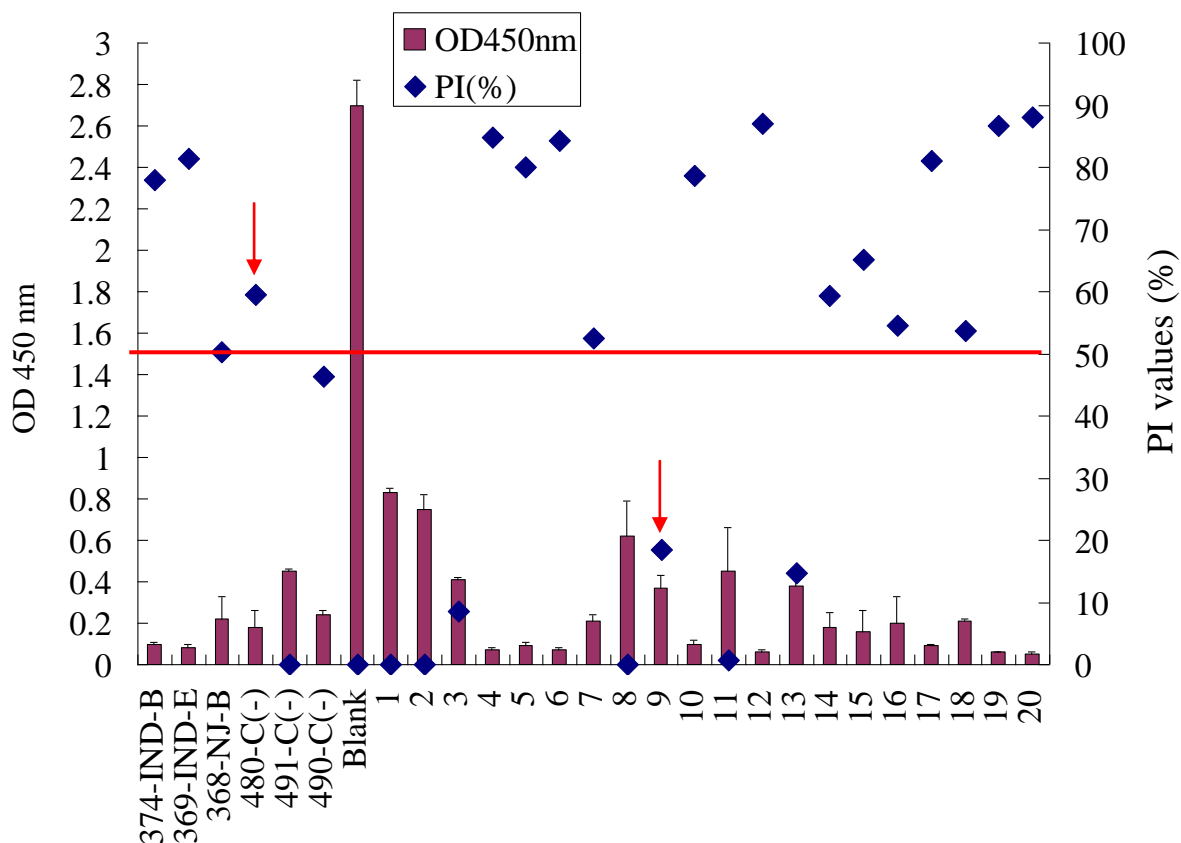
VSV 及 FMDV 抗體檢測之樣品

圖 5、以 pCold TF 質體表現 NJ-N 重組蛋白檢測牛血清中的水疱性口炎病毒 NJ/IND 抗體及口蹄疫病毒七種血清型之牛血清 (FMDV serotypes O、A5、C3、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3) 之結果。在間接型三明治 ELISA 試驗中，與含鍵結 HRP 的 goat anti-bovine IgG 進行抗原與抗體之結合反應，紅色柱狀標示為陽性及藍色柱狀標示為陰性結果。臨界值 (cutoff value) 之 OD 450 nm 值 ≥ 0.15 以上為陽性，OD 450 nm 值 < 0.15 為陰性結果。374 (+)-IND、368 (+)-NJ 及 No.4~20 為 VSV 感染牛隻或馬匹之陽性標準血清，491 (-)、480 (-) 及 No.1-3 為 VSV 陰性血清，血清型 O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3 等 7 支為口蹄疫陽性標準血清，Blank 為不加血清的緩衝液。長條圖紅色標示為 VSV 陽性牛血清。



VSV 抗體檢測之控制組與血清樣品

圖 6、以 pCold TF 質體表現的 NJ-N 重組蛋白檢測馬血清中的水疱性口炎病毒 NJ/IND 抗體結果。在間接型三明治 ELISA 試驗中，與含鍵結 HRP 的 goat anti-horse IgG 進行抗原與抗體之結合反應，紅色柱狀標示為陽性及藍色柱狀標示為陰性結果。臨界值(cutoff value)之 OD 450 nm 值 ≥ 0.15 以上為陽性，OD 450 nm 值 < 0.15 為陰性結果。369 (+) -IND 及 No. 4~20 為 VSV 感染牛隻或馬匹之陽性標準血清，491 (-) 及 No.1-3 為 VSV 陰性血清，Blank 為不加血清的緩衝液。長條圖紅色標示為 VSV 陽性馬血清。



VSV 之陽性及陰性控制組血清樣品

圖 7、以 pCold TF 質體表現的 NJ-N 重組蛋白檢測牛及馬的 NJ/IND 抗體的結果。在競爭型 ELISA 試驗中，與含鍵結 HRP 的 IND 多株抗體進行競爭性反應。臨界值 (cutoff value) 之 PI 值 $\geq 50\%$ ($OD \leq 0.22$) 為陽性，PI 值 $< 50\%$ ($OD > 0.22$) 為陰性結果。374 (+)-IND、369 (+)-IND、368 (+)-NJ 及 No.4~20 為 VSV 感染牛隻或馬匹之陽性標準血清，480-C (-)、491-C (-)、490-C (-) 及 No,1-3 為 VSV 陰性對照血清，Blank 為不加血清的緩衝液。紅色箭頭標示為與 NJ-N 間接型 ELISA 不符合的結果。

參考文獻

1. Afshar A, Dulac GC, Wright PF, Martin D. Application of indirect ELISA for detection of bovine antibodies against vesicular stomatitis viruses. *J Vet Diagn Invest.* 5(1): 26-32, 1993.
2. Afshar A, Shakarchi NH, Dulac GC. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine, ovine, porcine, and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol.* 31 (7) : 1860-1865, 1993.
3. Allende R, Germano PM. Comparison of virus neutralisation and enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of antibodies against vesicular stomatitis (Indiana 3) virus. *Rev Sci Tech.* 12 (3) : 849-855, 1993.
4. Alonso A, Martins MA, Gomes Mda P, Allende R, Söndahl MS. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing, and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J Vet Diagn Invest.* 3(4): 287-292, 1991.
5. Alvarado JF, Dolz G, Herrero MV, McCluskey B, Salman M. Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana. *J Vet Diagn Invest.* 14 (3) : 240-242, 2002.
6. Callens M, De Clercq K. Highly sensitive detection of swine vesicular disease virus based on a single tube RT-PCR system and DIG-ELISA detection. *J Virol Methods.* 77 (1) : 87-99, 1999.
7. Ferris NP, Donaldson AI. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. *Vet Microbiol.* 18 (3-4) : 243-258, 1988.
8. Ferris NP, Clavijo A, Yang M, Velazquez-Salinas L, Nordengrahn A, Hutchings GH, Kristersson T, Merza M. Development and laboratory evaluation of two lateral flow devices for the detection of vesicular stomatitis virus in clinical samples. *J Virol Methods.* 180 (1-2) : 96-100, 2012.
9. Grigera PR, Garcia-Briones M, Periolo O, la Torre JL, Wagner RR. Immunogenicity of an aphthovirus chimera of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 70 (12) : 8492-8501, 1996.
10. Heo EJ, Lee HS, Jeoung HY, Ko HR, Kweon CH, Ko YJ. Development of a blocking ELISA using a recombinant glycoprotein for the detection of antibodies to vesicular stomatitis New Jersey virus. *J Virol Methods.* 164 (1-2) : 96-100, 2010.
11. Hernández De Anda J, Salman MD, Webb PA, Keefe TJ, Arregín Arévalo A, Mason J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to vesicular stomatitis virus in cattle in an enzootic region of Mexico. *Am J Vet Res.* 53 (4) : 440-443, 1992.
12. Hua QY, NY, Xu ZZ, Yang YQ, Dong J, Yang JY, Zhou XL. Expressing of N gene encoding nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus and elementary application in ELISA. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 20 (1) : 130-135, 2004.
13. Katz JB, Eernisse KA, Landgraf JG, Schmitt BJ. Comparative performance of four serodiagnostic procedures for detecting bovine and equine vesicular stomatitis virus antibodies. *J Vet Diagn Invest.* 9 (3) : 329-331, 1997.
14. Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA. Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J Virol Methods.* 54 (2-3) : 145-157, 1995.
15. Kweon CH, Kwon BJ, Kim IJ, Lee SY, Ko YJ. Development of monoclonal antibody-linked ELISA for sero-diagnosis of vesicular stomatitis virus (VSV-IN) using baculovirus expressed glycoprotein. *J Virol Methods.* 130 (1-2) : 7-14, 2005.
16. Lee HS, Heo EJ, Jeoung HY, Ko HR, Kweon CH, Youn HJ, Ko YJ. Enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein and monoclonal antibody for detecting antibodies to vesicular stomatitis virus serotype New Jersey. *Clin Vaccine Immunol.* 16 (5) : 667-771, 2009.

17. Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol.* 43 (3) :1213-1219, 2005.
18. Ma Y, Li J. Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus. *J Virol.* 85 (6) : 2942-2952, 2011.
19. Rodriguez-Sanchez B, Sanchez-Vizcaino JM, Uttenthal A, Rasmussen TB, Hakhverdyan M, King DP, Ferris NP, Ebert K, Reid SM, Kiss I, Brocchi E, Cordioli P, Hjerner B, McMenamy M, McKillen J, Ahmed JS, Belak S. Improved diagnosis for nine viral diseases considered as notifiable by the world organization for animal health. *Transbound Emerg Dis.* 55 (5-6) : 215-225, 2008.
20. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 2.1.19. Vesicular stomatitis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 7th ed., OIE, Paris, 2010.
21. Zhou EM, Riva J, Clavijo A. Development of an immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine and swine IgM antibodies to vesicular stomatitis virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8 (3) : 475-481, 2001.

Standard diagnostic test of the vesicular stomatitis stomatitis

TH Chen^{*}, CH Pan, F Lee, YL Lin, ML Wang, CN Shih, WL Yu, TS Huang, HJ Tsai

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract There are three pig vesicular diseases which are difficult to differentiate clinically vesicular stomatitis (VS), foot-and-mouth disease (FMD) and swine vesicular disease (SVD). However, recombinant envelope glycoprotein (GP) and nucleocapsid protein (N) of vesicular stomatitis virus (VSV), including serotypes of New Jersey and Indiana, can be employed as differential diagnostic tool. The antigenic domains on these recombinant proteins are highly immunogenic. Our study aimed to develop both competitive and indirect ELISAs for the detection of antibodies against VSV according to the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals published by OIE in 2010. Standards for competitive and indirect ELISAs have been established based on numerous factors, such as convenience, stability, sensitivity, specificity and safety. Testing anti-VSV antibodies using VSV-infected bovine and horse sera, analysis sensitivity and specificity reached $10^{-3.0}$ fold, while diagnostic sensitivity and specificity tested around 94.0% and 90.0%, respectively. The results indicated that both ELISA protocols could detect anti-VSV antibodies in the serum samples without cross-reacting with the anti-FMDV antibodies; thus, they would be useful as serological differential tools for vesicular diseases.

Key words: vesicular stomatitis (VS), antibody detection, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

