

## 口蹄疫及豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

陳姿菡<sup>1,2\*</sup>、潘居祥<sup>1</sup>、李璠<sup>1</sup>、林有良<sup>1</sup>、王明隆<sup>1</sup>、石佳霓<sup>1</sup>、蔡向榮<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>國立臺灣大學獸醫專業學院

**摘要** 本試驗針對口蹄疫 (FMD) 及豬水疱病 (SVD) 等豬隻高度傳染水疱性疾病，主要利用原核表現系統完成建立此二種疾病區別診斷之 FMDV 及 SVDV 間接型 ELISA 抗體檢測方法。針對 FMDV 結構蛋白 (SP) VP1 免疫決定位之基因組核酸序列設計引子，以 RT-PCR 方法增幅病毒核酸，建構基因重組原核表現系統，並量產重組結構蛋白應用於 ELISA 之開發。經試驗結果顯示分子量如預期之大小約 25 kDa，且重組蛋白質與豬抗血清之分析特異性呈陽性反應。以免疫、感染及 SPF 等豬血清之 FMDV-SP 抗體檢測診斷敏感性達 84.1 %-96.7 % 及診斷特異性約達 93 %-100 %。另設計豬水疱病病毒 SVDV-SP 之免疫決定位之核酸序列之特異性引子，以 RT-PCR 方法增幅病毒核酸，建構基因重組原核表現系統，並定序確認核酸序列符合，且重組蛋白分子量如預期之大小約 100 kDa，可與豬抗血清呈專一特異性之陽性反應。於 SVDV-SP ELISA 之結果顯示本方法的最低分析敏感性可達  $10^2$  倍，且於 30 支標準血清檢測結果最早在感染後第 6 天可被測出 SVDV-SP 抗體，其診斷敏感性及診斷特異性皆可達 100 %，於進口豬隻及田間之血清樣品經與二種商品化 ELISA 套組比較 SVDV-SP 抗體檢測結果符合率各別為 90-93 % 及 85-88 %。最後證實 FMDV 及 SVDV 抗體間接型 ELISA 檢測方法可檢出專一性的抗體而無交叉反應，且不會與水疱性口炎 (VS) 抗體產生非特異性反應。

**關鍵字：**口蹄疫、豬水疱病、結構性蛋白、抗體檢測、反轉錄聚合酶鏈反應、酵素連結免疫吸附法、病毒血清中和試驗。

### 緒言

口蹄疫 (FMD)、豬水疱病 (SVD)、水疱性口炎 (VS) 及豬水疱疹 (VES) 等均為豬隻高度傳染水疱性疾病 [18]。FMD 病毒是正股 RNA 病毒，在 *Picornaviridae* 科之成員中隸屬於 *Aphthovirus* 屬，為小的無封套病毒，含有 8.5 kbp 基因可轉譯出 12 個

包括結構 (SP) 與非結構蛋白 (NSP) 等病毒蛋白，本病毒含有 7 種血清型 [2, 20]。豬水疱病係豬隻之高度傳染性疾病，其病原屬於小核糖核酸病毒科 *Picornaviridae* 腸病毒屬 *Enterovirus* 之豬水疱病病毒，病毒顆粒大小 30-32 nm，不具封套，核酸為單股正鏈 RNA。病毒抗原性和人類腸病毒中的克沙奇病毒 B5 群 CVB5 相似性極高，採用免疫血清學方法難以

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

區別。從多株抗體研究顯示，SVDV不同分離株間之抗原性差異性非常小，因此一般認為SVDV只有一種血清型 [4,6,16,21,27]。水疱性口炎之感染宿主範圍為牛、豬、馬、驢、騾、駱駝、綿羊、山羊等動物，隸屬於 *Rhabdoviridae* 科中 *Vesiculoviruses* 屬之成員，本病常發生於美國，流行的病毒株包括 New Jersey 株及 Indian 株，也曾發生於法國及南非 [22]。另外還有豬水痘疹，這些疾病之臨床症狀頗為相似致臨床診斷難以區別。

近幾年來，針對豬隻水疱性疾病之試驗研究，已有多種應用於牛、豬、羊動物等抗原及抗體檢測，如 ELISA、RT-PCR、Real time RT-PCR、生物晶片、免疫色層分析測試片 (Lateral flow devices ; LFD)、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 及 Multiplexed Luminex 等方法 [1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 17, 20, 21, 22, 24] 於國際期刊上發表。目前國內外已有許多農業生物技術及醫藥開發應用係利用外源蛋白表現系統表現標的蛋白如原核及真核細胞，作為補捉動物血清抗體之抗原工具。國外目前所研發 SP 抗體試劑已具有檢測源自疫苗接種及感染動物的能力，且多著重於發展快速也能準確檢測口蹄疫抗體的 ELISA 新方法及技術，同時更要求診斷技術須符合一致化和標準化。

依據世界動物衛生組織 (World Organization for Animal Health, Office International Des Epizooties ; OIE) 2012年第七版-陸生動物診斷試驗及疫苗手冊 (Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial animals) 所載，計有病毒血清中和試驗 (Virus neutralization test ; VNT)、液相阻斷型 ELISA (Liquid phase blocking ELISA ; LPB-ELISA) 及固相競爭型 ELISA (Solid-phase competition ELISA) 等，此三種方法常被用來檢測血清中 SP 抗體是否存在，以作為口蹄疫或豬水痘病及水疱性口炎之例行性血清學監測方法 [20, 21, 22]。據文獻報告指出液相阻斷型之 ELISA 主要缺點即不活化抗原不穩定且特異性相當低，因此已被固相競爭型 ELISA 取代。近年的研究報告指出以 FMDV-VP2 蛋白製成單株抗體，應用於研發競爭型 ELISA 抗體檢測，試驗結果顯

示與檢測非結構蛋白抗體的 UBI kit 有 89 % 符合率，與 Ceditest kit 有 86.5 % 的符合率 [23]。試驗以 B 細胞免疫決定位顯示位於 FMDV-O 型的 VP1 結構蛋白以作為檢測病毒的抗體，或者利用此部位 133-160 a.a. 的 N 端連結 cysteine 及加上 keyhole limpet homocyanin (KLH) 之攜帶蛋白合成 peptide 抗原製作成中和性單株抗體，為檢驗試劑的基質 [19]。研究發現經由接種 FMDV O 血清型不活化疫苗的牛隻引起 CD8 (+) T 細胞辨識 FMDV 的免疫決定位，從 FMDV 的 peptides 刺激 CD8 (+) T cells 分泌 gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) 的反應分析，顯示免疫決定位存在病毒的結構蛋白 P1D，包括口蹄疫血清 O 型 UKG/2001 病毒株的 795 到 803 的基因。(MHC) class I allele 是 N\*O2201 表示為 A31 單倍型。此免疫原會反應  $\alpha\beta$  CD8 (+) T 細胞誘導 IFN- $\gamma$  的釋放，增生及殺死標的細胞，而不是 CD4 (+) T 細胞 [14]，所以結構性蛋白 VP1 具有病毒的中和作用之外，另有 B 和 T 細胞的免疫決定位，可作為重組 DNA 和 protein 疫苗標的物的參考 [13,15,25,26]。有研究者利用 FMDV O 型 VP1 表現蛋白當作檢測之抗原以發展免疫色層分析測試片 (Chromatographic strip)，皆具有很高的特異性與敏感性 [25]。故 FMDV 結構蛋白一直是研究的方向標的，製成單株抗體以三明治直接或間接檢測抗原，或者以原核或真核表現重組蛋白抗原以檢測抗體，或以 peptide 組合模式以發展檢測抗體，利用免疫色層分析測試片快速檢測法、酵素連結免疫吸附法 (ELISA)、多樣性 Luminex 檢測法 (xMAP) 等方法，以符合試驗診斷技術一致化和標準化的要求，也是未來實驗研究的發展目標與方向。

豬水痘病 (SVD) 屬於須通報的動物傳染病，歐洲各國皆以撲殺及嚴格限制牲畜移動方式來控制本病。根據 OIE 陸生動物衛生法典所載，抗體檢測是診斷本病的重要方法，亦是撲滅本病的重要工具 [21]。經驗顯示，田間血清檢測時常出現偽陽性，造成抗體檢測判定上的困難 [11]。故將開發 SVD 間接型 ELISA 抗體檢測方法，並與市售 SVD 競爭型及阻斷型抗體檢測套組比較分析，進一步探討解決抗體檢測出現偽陽性的問題。

## 材料與方法

### 口蹄疫抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

#### 一、設計特異性引子及使用 RT-PCR 方法增幅核酸產物

針對 B 細胞免疫決定位顯示位於口蹄疫病毒 (FMDV) O 血清型結構蛋白 (SP) 核酸序列設計特異性引子，以 RT-PCR 方法增幅 FMDV/O/TW/97 病毒之結構蛋白基因 VP1 核酸產物，經質體構築與轉形作用，選殖最佳表現重組蛋白的菌株，以蛋白質電泳膠分析 (SDS-PAGE assay) 確認蛋白質分子量之大小，量產及以低壓色層分析儀 (Low-pressure liquid chromatography; LPLC) 完成親和性色層分析 (Ni-NTA) 之重組蛋白質純化。

#### 二、血清樣品

試驗抗血清樣品包括以口蹄疫 FMDV O/TW/97 病毒株  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub> / 500 uL 8週齡無特定病原 (SPF) 豬 (購自台灣動物科學研究所) 攻毒試驗且於攻毒後 28-34 天所採血收集之 30 支及 44 支免疫等陽性血清樣品，另有購自英國 Pirbright 研究所 6 支 RS1-RS6 的豬水疱病 (SVDV) 抗血清 (UKG/27/72 strain; EU SVD reference serum batch 2002) (RS1 為陰性; RS2 為強陽性; RS3、RS5 及 RS6 為中陽性; RS4 為低陽性)、購自美國 National Veterinary Services Laboratories 2 支水疱性口炎 (VSV) 陽性標準血清及 44 支 SPF 等陰性豬隻抗血清。

#### 三、計算蛋白質濃度測定

利用分光光度儀建立標準蛋白 BSA 曲線，以計算未知蛋白質濃度。

#### 四、分析重組蛋白質與抗體之反應

以 SDS PAGE 及西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay) 證實功能性蛋白質能與抗體反應。

#### 五、ELISA 抗原盤之最適化抗體定量條件之分析

以陽性及陰性對照血清評估 ELISA 抗原盤之最適化抗體定量條件分析。

#### 六、口蹄疫病毒血清中和試驗 (Virus

#### neutralisation test; VNT)

依據 OIE 手冊 (Chapter 2.1.5)。於倒立顯微鏡依序由低至高稀釋倍數判讀陽性及陰性血清對照的結果，並計算與記錄培養盤中各孔產生細胞病變現象 (Cytopathic effects; CPE) 的數目，及計算中和試驗之病毒回歸力價中出現組織培養所感染一半的劑量 (Tissue culture infective doses; TCID<sub>50</sub>)。然抗體力價係以 50 % CPE 抑制計算之，亦即在可抑制一半細胞孔出現 CPE 之血清最高稀釋倍數即為抗體力價 (SN<sub>50</sub>)，判讀依據  $\geq 1:45$  為陽性;  $1:16$ - $1:32$  為疑陽性;  $< 1:16$  為陰性反應等 [20]。

#### 七、確效試驗之評估

本方法之確效試驗使用攻毒試驗陽性血清評估敏感性方法，另以 SPF 及疫苗免疫豬血清等樣品評估特異性方法，及測試田間血清樣品之再現性等分析。

#### 八、方法學之比較與統計分析

依據新研發口蹄疫間接型 ELISA 與 OIE 金標準方法的口蹄疫病毒血清中和抗體試驗等結果，進行 Kappa 值及直線回歸分析 (Linear regression analysis) 的相關性比較。

#### 九、與其他水疱性疾病抗體交叉反應之測試

評估本方法與其他水疱性疾病包括豬水疱病及水疱性口炎等抗體結果評估交叉反應試驗。

### 豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

#### 一、反轉錄聚合酶鏈反應 (RT-PCR)

增幅 SVDV 之 VP1 基因並加入限制酵素切位 *Bam*HI 及 *Hind*III。將 RT-PCR 產物選殖至 YT & A 載體 (selection marker 為 Ampicillin) 並定序確認序列。

#### 二、構築重組蛋白

將 SVDV-VP1 基因片段次選殖含有篩選標示的 Ampicillin 如 pET32a、pCOLD、SUMO 等不同之質體，並依產品操作說明送入 BL21 (DE3) (Novagen, EMD Biosciences Inc. San Diego, CA, U.S.A.) 表達細胞，在最適化的培養條件 (37°C, 250 rpm) 下，由最終濃度 1 mM 的 Isopropylthiogalactoside (IPTG) 進行誘導量產可溶性 SVDV-VP1 重組蛋白。

#### 三、重組蛋白之量產及純化

以 BL21 (DE3) 菌株大量表達可溶性 SVDV-VP1 重組蛋白，並以 Ni-NTA column 純化重組蛋白。

#### 四、ELISA 抗原盤之製作

將純化之 SVDV-VP1 重組蛋白 (2mg/mL) 以 coating buffer (0.06 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6) (KPL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 培養 4°C 隔夜或 37°C 1 小時披覆於 96 孔抗原盤，發展間接 ELISA 抗體檢測方法。

#### 五、ELISA 最適化及反應條件之建立

量化 SVDV-VP1 重組蛋白抗原披覆之最佳濃度，試製抗原盤。

#### 六、標準血清組

試驗血清樣品包括以 30 支 8 週齡無特定病原 (SPF) 豬 (購自台灣動物科學研究所) 經 SVDV  $10^5$ - $10^6$  TCID<sub>50</sub> / 500  $\mu$ L 攻毒試驗且於攻毒後 28 天採血採集及 44 支免疫二次等陽性血清樣品，及 44 支 SPF 等陰性豬隻血清，另有 6 支購自英國 Pirbright 研究所的 SVDV 抗血清 RS1-RS6 (UKG/27/72 strain; EU SVD reference serum batch 2002) (RS1 為陰性; RS2 為強陽性; RS3、RS5 及 RS6 為中陽性; RS4 為低陽性)、購自美國 National Veterinary Services Laboratories 2 支水疱性口炎 (VS) 等陽性標準血清。

#### 七、比較試驗

比較本方法 SVDV 間接型 ELISA 與商品化 SVDV 競爭型或阻斷型 ELISA 抗體檢測方法之敏感性及特異性的差異。

### 結果

#### 口蹄疫抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

##### 一、設計特異性引子及使用 RT-PCR 方法增幅核酸產物

以 B 細胞免疫決定位顯示位於 O/TW/97 口蹄疫病毒的 VP1 結構性蛋白之特異性引子的設計，並利用 RT-PCR 方法增幅核酸產物，大小為 132 bp，將構築選殖後質體完成嵌入序列大小之鑑定，另比對定序結

果證實與基因庫核酸標準序列 (GenBank accession 為 No. NC\_004004) 及氨基酸的序列皆 100 % 符合 (圖 1)。

最後選取應用於本試驗方法的 FMDV-VP1 特異性引子如下，可增幅口蹄疫病毒 O/TW/97 株 VP1 基因為 132 bp，並於正股及反股之 5' 端加入限制酶切位 *Bam*HI 及 *Eco*RI，其他引子 (Data not shown)。

(1) FMDV-VP1-*Bam*HI-F- 5'-CACCGGATCCTGTGCGTGTCTTAGCGACCGTCTACAAC-3'。

(2) FMDV-VP1-*Eco*RI-R-5'-CCCGAATTCGCGCAA GCACCGAAGTTGAAGGAGGTAGG-3'。

#### 二、融合蛋白質的量產誘導表現及純化

口蹄疫病毒 VP1 結構重組蛋白誘導表現，從 SDS PAGE 分析證實分子量如預期之大小分別約 25 kDa (圖 2)。

#### 三、重組蛋白質之功能性試驗

以西方墨點轉漬分析法 (Western blot assay) 經試驗證實重組蛋白會與 FMDV 陽性豬血清之多株抗體 (VNT 抗體力價檢測為 512 倍) 結合，於檢測後有陽性訊號反應 (圖 2)。

#### 四、ELISA 抗原盤之最適化抗體定量條件之分析

將純化之口蹄疫病毒 VP1 結構重組蛋白，及計算蛋白質濃度經測定後分別為 9.8 mg/mL，以 2 倍系列稀釋抗血清 1:4 至 1:512 選擇最適化條件，以發展抗體檢測的間接型 ELISA 方法 (圖 3)。

#### 五、確效試驗之評估

以間接型 ELISA 分析進行口蹄疫病毒 VP1 結構重組蛋白與 44 支免疫及 30 支感染豬血清之抗體檢測，依據臨界值 (Cut off values) OD<sub>450nm</sub>  $\geq$  0.23 為陽性，OD<sub>450nm</sub> < 0.23 則為陰性，診斷敏感性結果各別可達 84.1 % (37/44) - 96.7 % (29/30) 與 44 支 SPF 豬血清及 1 支 SVDV 陰性標準血清及 5 支 SVDV 及 2 支 VSV 之陽性標準血清之特異性試驗評估之結果各別可達 93 % (42/45) - 100 % (7/7)。

## 六、方法學之比較與分析

於44支免疫血清之口蹄疫間接型ELISA與SNT二者之定量測試結果發現有部份正相關，表示 OD 值與  $SN_{50}$ 之間的抗體力價結果相關性較低 ( $R^2$  約為 0.71)，Cohen's kappa為0.45 表示二種方法為中度符合且呈顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。此依據ELISA之Cut off values  $OD_{450nm} \geq 0.23$  為陽性， $OD_{450nm} < 0.23$ 則為陰性；SNT的 $SN_{50} \geq 1:16$ 為陽性， $< 1:16$ 為陰性，顯示二種方法之定性結果符合率約達 84.1% (37/44)及不符合率為15.9% (7/44) (圖4)。

## 七、與其他水疱性疾病抗體交叉反應之測試

口蹄疫間接型ELISA具有檢測 O/TW/97 及 O/TW/99 二者抗體的能力 (圖5)，且不會與豬水疱病 (SVD) 及水疱性口炎 (VS) 之抗血清產生非特异性反應 (Data not shown)。

## 豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

### 一、引子設計

設計可增幅VP1全長基因之引子並加入限制酶切位 *Bam*HI及 *Hind*III，可增幅豬水疱病毒臺灣株全長VP1共846 bp。

(1)SVD-VP1-BamHI-F 5'-GGATCCGGA

CCCCCAGGGGGAG-3'。

(2)SVD-VP1-HindIII-R 5'-AAGCTTGGTGG

TCCTCATGGTTGTTAT-3'。

### 二、標的基因選殖於質體

針對豬水疱病毒全長VP1基因設計之引子，以SVDV臺灣株 (SVD-TW-99) 進行RT-PCR增幅，及含有12個限制酶切位的終產物長度為858 bp，經PCR產物純化套組純化後以TA cloning 法選殖於yT&A質體，將質體轉殖於大腸菌內，經塗菌、鈎菌後抽取質體並進行定序反應以確定序列正確性。

### 三、標的基因次選殖於表現載體

以 *Bam*HI及 *Hind*III限制酶將VP1 基因自yT&A質體切下後次選殖到 pCold及 SUMO 表現載體並轉形DH5  $\alpha$  勝任細胞，抽出殖體以 *Bam*HI及 *Hind*III限制酶切下標的基因，故自表現載體回切確認VP1-858 bp

基因選殖成功 (圖6)。

## 四、含標的基因之表現載體轉形於表現宿主

將含VP1基因之殖體轉形至BL21表現宿主，繼20 mL的培養菌液以IPTG誘導表達VP1 重組蛋白，經破菌後，將上清液及沉澱分別以SDS-PAGE跑膠後以Coomassie blue染色後可視重組蛋白的分子量約為100 kDa的結果 (圖7)。

## 五、以 Ni-NTA 純化重組蛋白後跑 SDS-PAGE

將重組蛋白通Ni-NTA管柱純化，以100-250 mM不同濃度之imidazole沖洗並分管收集後跑SDS-PAGE圖 (圖8)，純化之蛋白質濃度約有2 mg/mL。

## 六、純化之重組蛋白以抗 SVDV 豬隻多株抗體染色

不同濃度imidazole沖洗之重組蛋白以100X抗SVDV豬隻多株抗體染色Western Blot (圖9)。

## 七、ELISA 最適化及反應條件之建立

量化VP1重組蛋白抗原披覆之0.40  $\mu$ g/well，試製抗原盤。以豬水疱病病毒間接型ELISA

方法測試SVDV重組蛋白對陽性、陰性及標準血清等抗體檢測之能力，結果顯示本方法

可檢測到特异性的SVDV抗體 (圖10)。

## 八、標準血清組及比較試驗

以豬水疱病病毒 (SVDV) 間接型ELISA方法檢測3頭試驗攻毒豬之血清樣品 (2128、2129、2130)，於感染後0、2、4、6、8、10、14、21、28、34天 (DPI)，共採集有30支標準血清。經間接型ELISA檢測結構性蛋白VP1抗體之結果 Cut off值於 $OD_{450nm}$ 為0.22-0.25，陽性對照組約1.79，陰性對照組約0.06，Blank 約0.04 (圖11)。經測試結果顯示本方法的最低分析敏感性可達  $10^2$  倍，且於30支試驗攻毒血清之抗體檢測動力學結果發現最早在感染後第6天DPI可被測出SVDV抗體，以其中3支14DPI的陽性抗體檢測結果評估診斷敏感性為100% (3/3)，以3支0 DPI的試驗血清、30

支SPF及1支RS1等SVDV陰性血清評估診斷特異性皆可達100% (34/34)。另評估SVDV抗體檢測間接型ELISA與二種(A, B)商品化ELISA試劑套組之差異性比較,顯示於進口血清抗體檢測結果,以本法與A kit 的符合率為90% (65/72)、本法與B kit 的符合率為93% (67/72)。於田間血清抗體檢測結果,本方法與A kit 的符合率為85% (63/74)、本法與B kit 的符合率為88% (65/74)。且顯示本方法不會與口蹄疫(FMD)及水疱性口炎(VS)抗血清產生非特異性反應(Data not shown)。

## 討論

本試驗主要研發口蹄疫結構蛋白之ELISA抗體檢測方法,利用快速準確的ELISA方法取代及改善現階段實驗室常使用之OIE金標準的病毒血清中和試驗,目的為了提升如節省時間、減少人力、成本、操作方法簡單及快速獲得結果等優勢,建立具有敏感且可靠性之ELISA試劑套組。試驗過程發現所設計的口蹄疫基因片段的大小是否會影響抗原與抗體的結合作用,因此試驗比較 FMDV之蛋白質外鞘如VP1之B 細胞免疫決定位(Epitope)之基因組等重組基因技術上的改良,嘗試增強捕捉抗體結合之反應能力。

然而試驗完成口蹄疫病毒結構性蛋白(VP1)之免疫決定位之特異性引子的設計,其中FMDV-VP1於試驗報告中表示適合作為試驗檢測的標的物(Detector),將設計特異性的基因片段(VP1),利用遺傳基因重組的構築選殖後完成質體的嵌入與序列比對之鑑定,量產純化試驗所需的重組蛋白,且試驗結果產出之重組蛋白質確實可與口蹄疫陽性豬血清交互作用,具有高的分析特異性。另發現基因片段之大小對抗體的捕捉無顯著的不同。且分析重組蛋白質之濃度上,於低濃度之抗體檢測值不一定比高濃度者還要高(data not shown),因此可作為未來基因片段大小的設計參考,以解決避免原核表現系統易產生不可溶蛋白質所造成之構形改變及回收量低等問題。本試驗研發之IndirectELISA於免疫及感染豬血清之口蹄疫結構蛋白抗體檢測診斷敏感性可達84.1-96.7%,而診斷特異性可達93-100%。於免疫豬的樣品

定性檢測抗體的結果發現ELISA與病毒血清中和試驗(VNT)有部份正相關,而OD值與SN50之抗體力價的相關性較低故有顯著性差異( $P < 0.05$ ),且二種方法之定性符合率約84.1%,然不符合率有15.9%,因此推測這二種分析可能由於測試基質與試驗步驟的方法不同有關,故呈現的結果不完全相同,尤其有7個樣品仍存在有試驗的差異性(圖4)。然所研發的間接型ELISA是具有檢測O/TW/97及O/TW/99二者抗體的能力,且不會與豬水疱病(SVD)及水疱性口炎(VS)之抗血清產生非特異性反應。

故本試驗方法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,建議送檢樣品於試驗時可先行以ELISA快速篩選獲得抗體檢測的結果,再與需三天完成的病毒血清中和試驗之結果進一步比對,並改良找出二者方法之抗體力價的相關性,以朝向試驗目的即研發ELISA方法而取代改善病毒血清中和試驗等缺點,提升如節省時間、減少人力、成本、操作方法簡單及快速獲得結果等優勢,以達到有效評估免疫適期及免疫效力和摘除感染動物等防疫目標,及提供未來區別診斷試驗方法的參考。

SVDV感染的抗體反應非常快速,以IgM為檢測基礎的ELISA於感染後4天,即可於50%的實驗動物中偵測到初期的免疫反應,若採用病毒中和試驗需時5天,而以IgG為基礎的ELISA則需12天。雖然ELISA比起VNT較容易操作,但相對地也容易產生偽陽性反應[16],可藉由特定的單株抗體的使用增加其特異性。目前競爭型ELISA及VNT為最常被採用為血清學診斷方法,競爭型ELISA已有市售商品化套組,且是目前實驗室常使用的檢測的方法。血清學診斷時常會看到豬群中出現少數SVD抗體陽性豬隻,但卻又無任何臨床症狀,不曾接觸過發病豬,亦無疾病史。此現象稱為單一反應(Singleton Reactor; SR)。目前血清學檢測SVD碰到最大的問題是SR血清的出現,在日常血清學監測計畫中大約有0.3%血清會出現SR陽性,其中0.25%血清會呈現低倍中和抗體力價,0.07%血清會呈現高倍中和抗體力價。引起SR反應的原因尚未清楚,可能單純只是血清中含有高力價的非特異性抗體,特別是IgM的存在造成偽陽性[11,

21]。亦有可能豬隻被其他具有與SVDV相同抗原決定位 (epitopes) 的病毒所感染，值得注意的是SVDV病毒與Coxsackie B5病毒的抗原性很相似，與Coxsackie其他型病毒的抗原性也很相近，因此SR反應很有可能是因為豬隻感染此類與SVDV抗原性相似的病毒所造成的交叉反應。目前已完成豬水疱病病毒之重組結構蛋白與單株抗體之製備，從間接型ELISA試驗結果顯示該重組結構蛋白之抗體檢測可與FMDV及豬水疱性口炎病毒 (VSV) 能有效區別診斷，且於SVDV標準血清之陽性與陰性對照組抗體檢測結果符合率達100%，且發現以本土型SVDV/TW/99病毒株為模板產製的重組蛋白抗原對該病毒株攻毒的陽性血清有高值的SVDV抗體反應(圖10)，然對英國進口的標準陽性血清組 (RS2-RS6) 反應不佳，可能於核酸序列有部份的差異，經核酸序列比對的結果顯示本土型SVDV/TW/99病毒株與國內病毒株的相似性有94.5%，而與國外的病毒株比對的結果只有87.2%的相似性，因此以國外的ELISA試劑套組應用在我國的SVDV血清學的監控上，可能有低檢測率或無法檢出陽性樣品的疑慮。然經二種SVDV商品化試劑套組抗體檢測為陰性結果之進口豬隻及田間血清樣品測試後，與本方法之結果比較分別有

7-10%及12-15%之非特異性反應，猜想是試驗條件需有待進一步調整以趨於最佳理想化的狀況呢，還是重組蛋白質純化不完全(圖8及圖9)，或豬血清存在有類似腸病毒的抗體(如Coxsackie B5病毒)，或者是如前所預測等等將是我們未來研究團隊應努力確認證實的目標。

而SVDV間接型ELISA方法，由於為原核表現系統的試驗應用，可容易獲得高量產的可溶性重組蛋白質，且是由本土型的SVDV病毒株製作之重組蛋白，以期增加分析敏感性。另比較二種阻斷型或競爭型的商品化ELISA套組，其最大的差異在於本方法不含進口運費成本，可視送檢樣品量而調整產製，故相對可減少成本及提升成本效益比，可預期逐年使用增加以取代昂貴的進口試劑套組之需求而節省經費，然作為協助應用於臨床疾病之確診，並配合防疫體系以早期達到快速準確摘除潛伏感染動物的目標建立快速明確之多樣性檢測區別診斷方法，將了解田間豬體中是否同時感染該等水疱性疾病，也可應用於進口輸入動物的檢疫分析流程監控之方法，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，且提高社會產業競爭力，有利農畜牧業之永續發展。



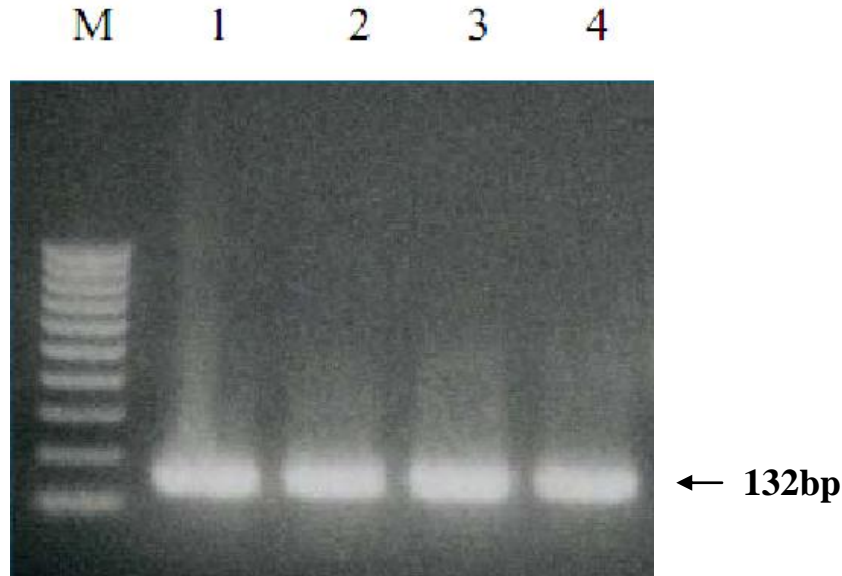


圖 1、口蹄疫病毒結構性蛋白抗體檢驗試劑套組之研發，以 RT-PCR 增幅 FMDV/O/TW/97 病毒之結構蛋白基因 VP1 核酸產物。依 100~1,000 bp DNA 標示物 Lane Marker (M) 作為比對 DNA 片段，Lane 1-4 : VP1- 132 bp。最後 PCR 產物分析於 1 % agarose gel 並以 SYBR Safe™ 染色燈照觀察表現結果。

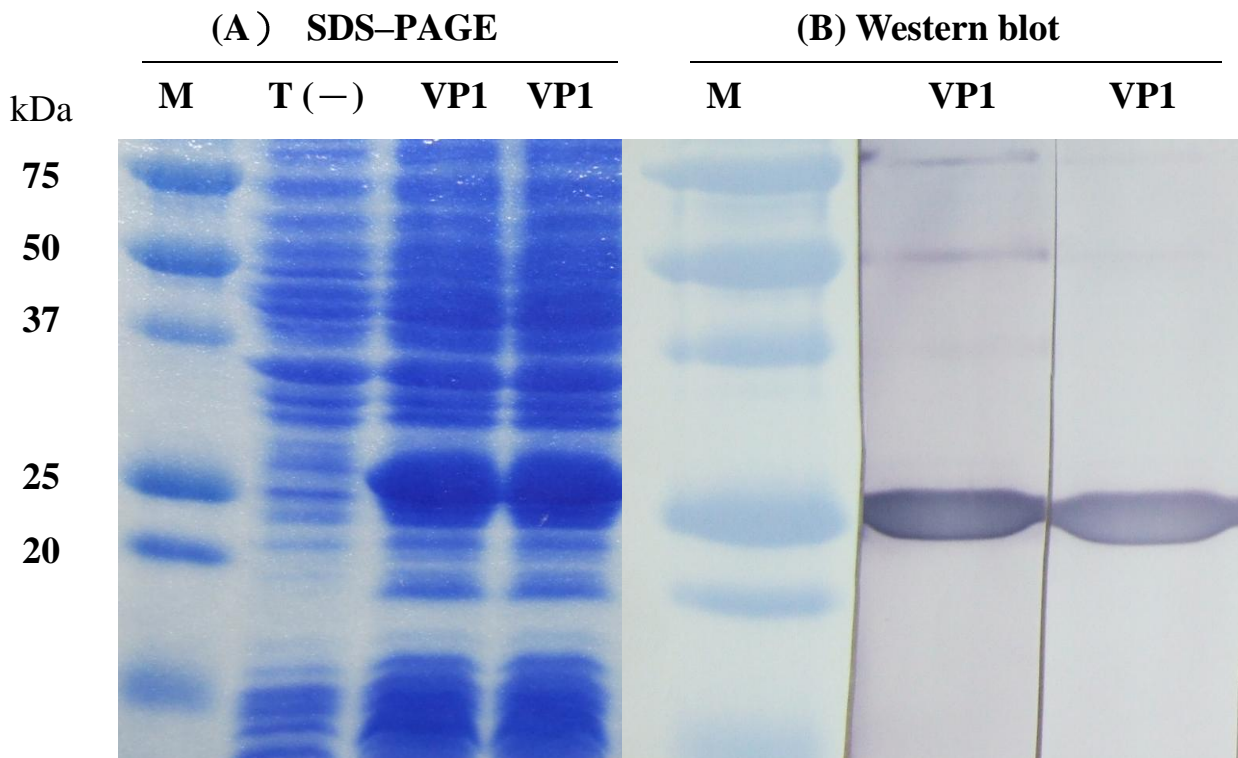


圖 2、經量產分析後獲得原核表現的口蹄疫重組蛋白，以 SDS-PAGE 經 Coomassie blue 染色 (A) 及 Western blot (B) 的試驗結果。T (-) 為萃取及轉形 pET 質體後之 BL21 (DE3) 細胞而未經 IPTG 誘導的陰性對照組；含有 VP1 epitope 質體的 BL21 (DE3) 細胞經最後濃度 1mM IPTG 誘導產生約 25 kDa FMDV-VP1 重組蛋白且會與感染豬血清出現明顯地陽性反應，M 表示標準分子量單位為 kDa (Kilodaltons)。



## 口蹄疫及豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

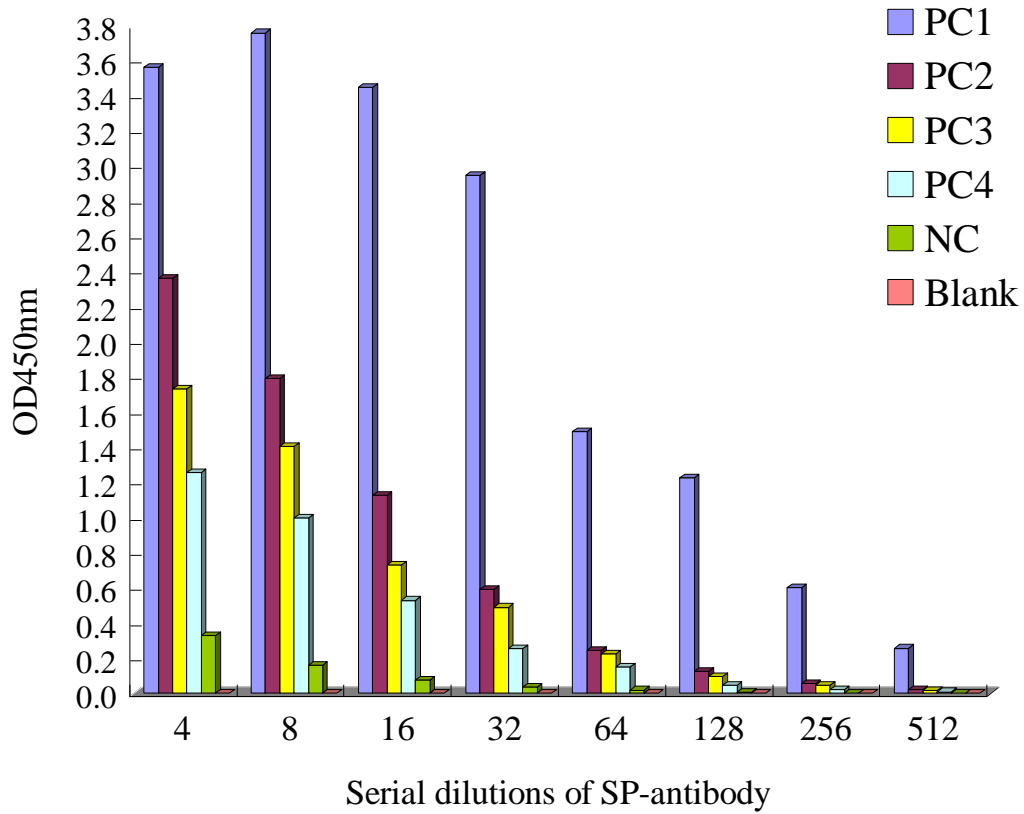


圖 3、以 Indirect ELISA 方法分析口蹄疫結構性蛋白 VP1 重組蛋白 (25 kDa) 之 2 倍系列稀釋後抗體檢測的結果，包括樣品有 4 支 (PC1、PC2、PC3、PC4) 等高、中及低抗體力價的陽性血清與 1 支陰性血清 (SPF) 及不含抗體的 PBS 空白組等抗原與抗體的之結合反應。

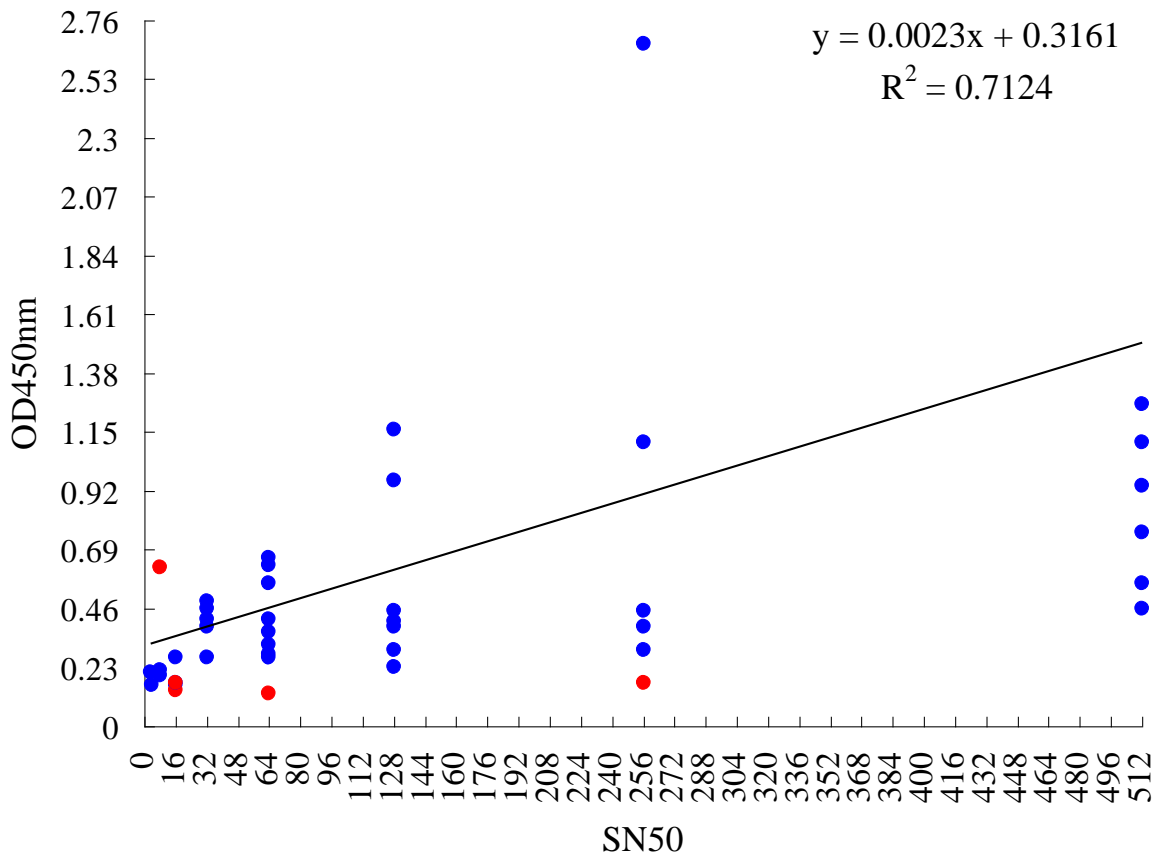
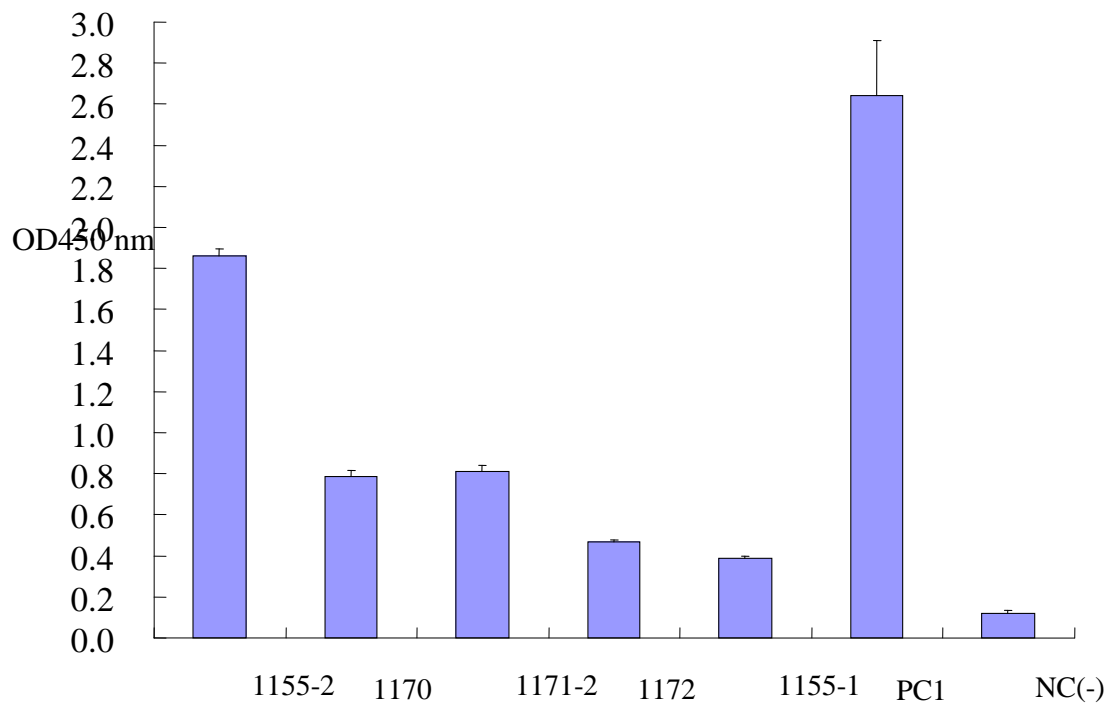


圖 4、評估 44 頭免疫豬血清樣品分別以 FMDV 抗體檢測間接型 ELISA 及 VNT 的 OD450nm 值與 SN<sub>50</sub> 力價之符合率比較及直線回歸分析的比較結果，藍色標示符合，紅色標示為不符合，於臨界點 (Cut off values) 的判定依據 ELISA 若 OD450nm ≥ 0.23 為陽性，OD450nm < 0.23 則為陰性；SNT 於 SN<sub>50</sub> ≥ 1:16 為陽性，SN<sub>50</sub> < 1:16 為陰性。

口蹄疫及豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發



Control sera of O/TW/99 and O/TW/97

圖 5、以口蹄疫間接型 ELISA 檢測口蹄疫 O/TW/99 病毒( 1155-2, 1170, 1171-2, 1172, 1155-1 ) 陽性、O/TW/97 ( PC1 ) 陽性及陰性 ( NC ) 等豬抗血清之結構蛋白抗體檢測之結果。

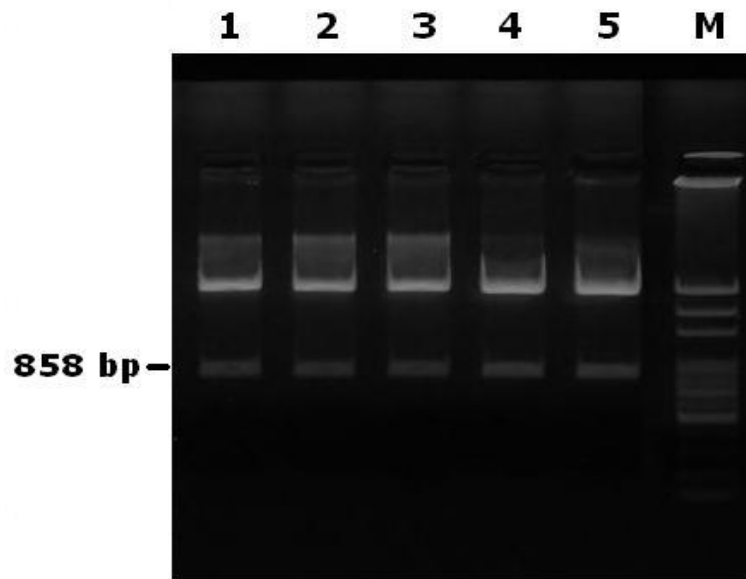
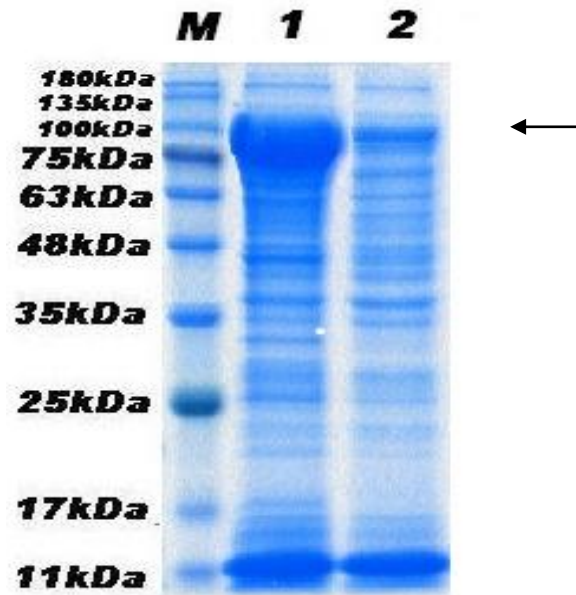
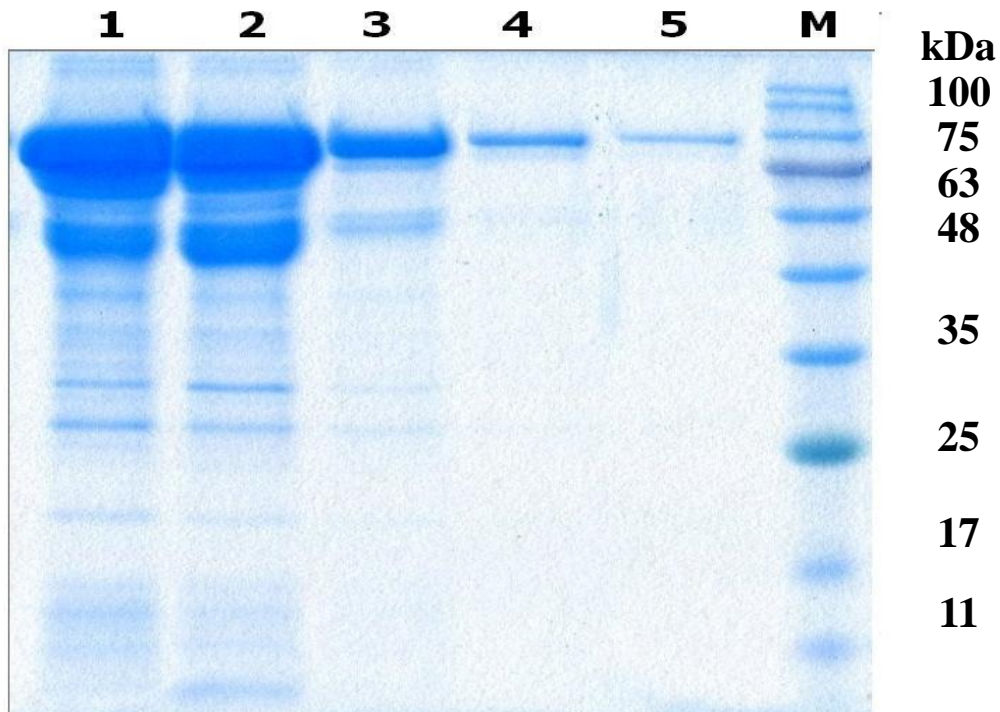


圖 6、豬水疱病間接型 ELISA 抗體檢測方法之研發，以 BamHI 及 HindIII 限制酶自表現載體回切確認 VP1-858 bp 基因選殖成功 ( Clones 1, 2, 3, 4 及 5 )，M：100 bp 梯型標誌。



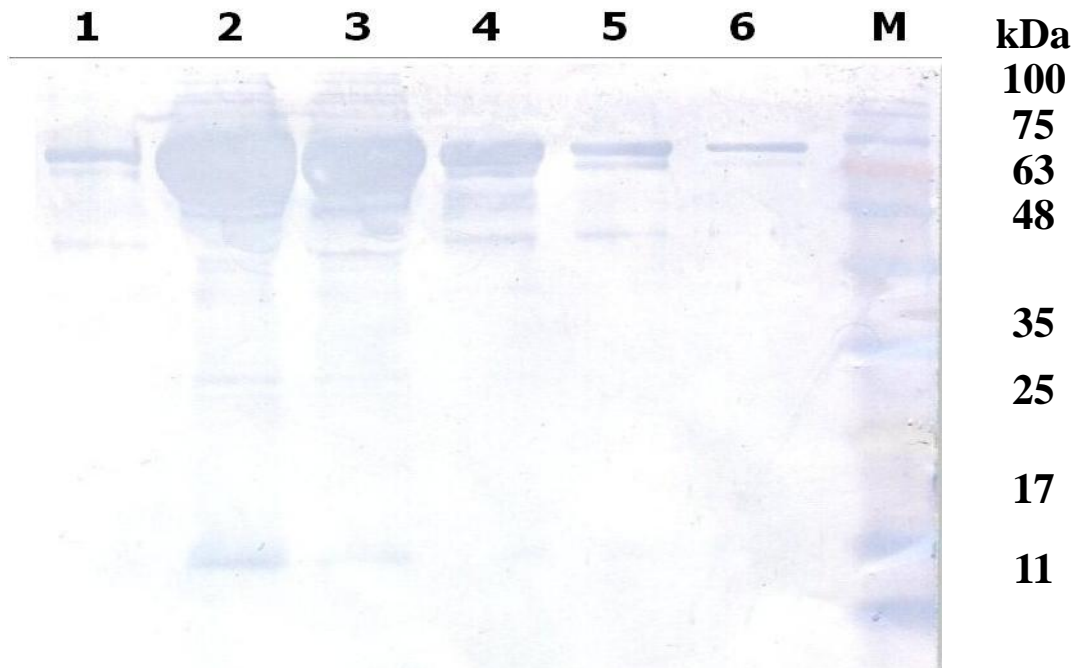
1. 破菌後之上清液取 16 uL 跑膠。
2. 破菌後之沉澱物，以 500 uL 之 DDW 回溶後取 16 uL 跑膠。

圖 7、SVD VP1 表達之重組蛋白經破菌後，將上清液及沉澱分別以 SDS-PAGE 跑膠後以 Coomassie blue 染色結果，分子量 (MW) 約 100 kDa 梯型標誌。



1. Elution 1 (100 mM imidazole) 、2. Elution 2 (100 mM imidazole) 、
3. Elution 3 (250 mM imidazole) 、4. Elution 4 (250 mM imidazole) 、
5. Elution 5 (250 mM imidazole) 。

圖 8、SVD VP1 重組蛋白經 Ni-NTA 純化後 SDS-PAGE 圖。



1. Elution 1 (100 mM imidazole) 、2. Elution 2 (100 mM imidazole) 、  
3. Elution 3 (250 mM imidazole) 、4. Elution 4 (250 mM imidazole) 、  
5. Elution 5 (250 mM imidazole) 、6. Elution 5 (250 mM imidazole) 。

圖 9、SVD VP1 重組蛋白經 Ni-NTA 純化後 Western Blotting 圖。

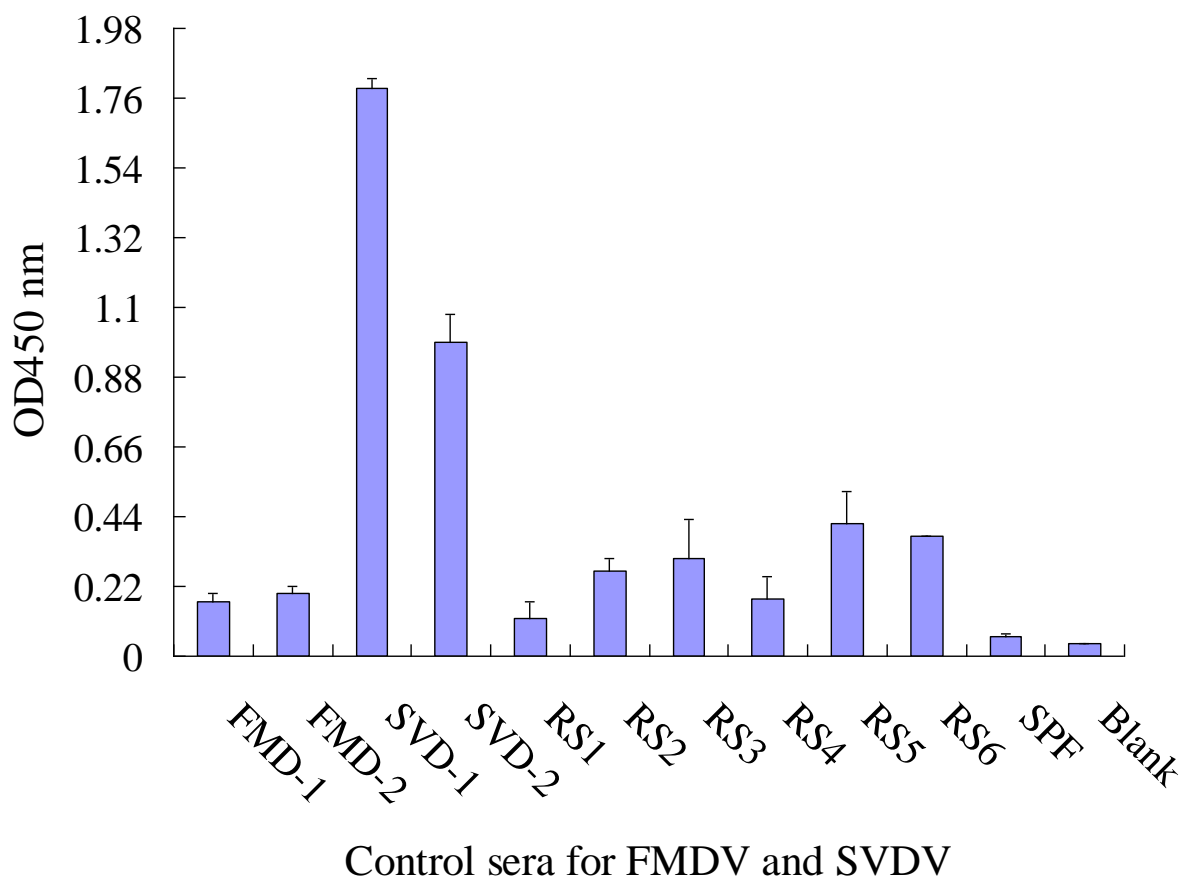


圖 10、以豬水疱病病毒間接型 ELISA 方法測試 SVDV 重組蛋白對陽性、陰性及標準血清等抗體檢測能力之結果。取自 FMDV 攻毒試驗的二支血清 FMD-1 及 FMD-2 為陽性對照組，以 SVDV 攻毒試驗的二支血清 SVD-1 及 SVD-2 為豬水疱病陽性對照組，RS1-RS6 為 SVD 標準血清組（RS1 為陰性及 RS2-RS6 為陽性），SPF 及 Blank 為陰性對照組。

口蹄疫及豬水疱病抗體間接型 ELISA 檢測方法之研發

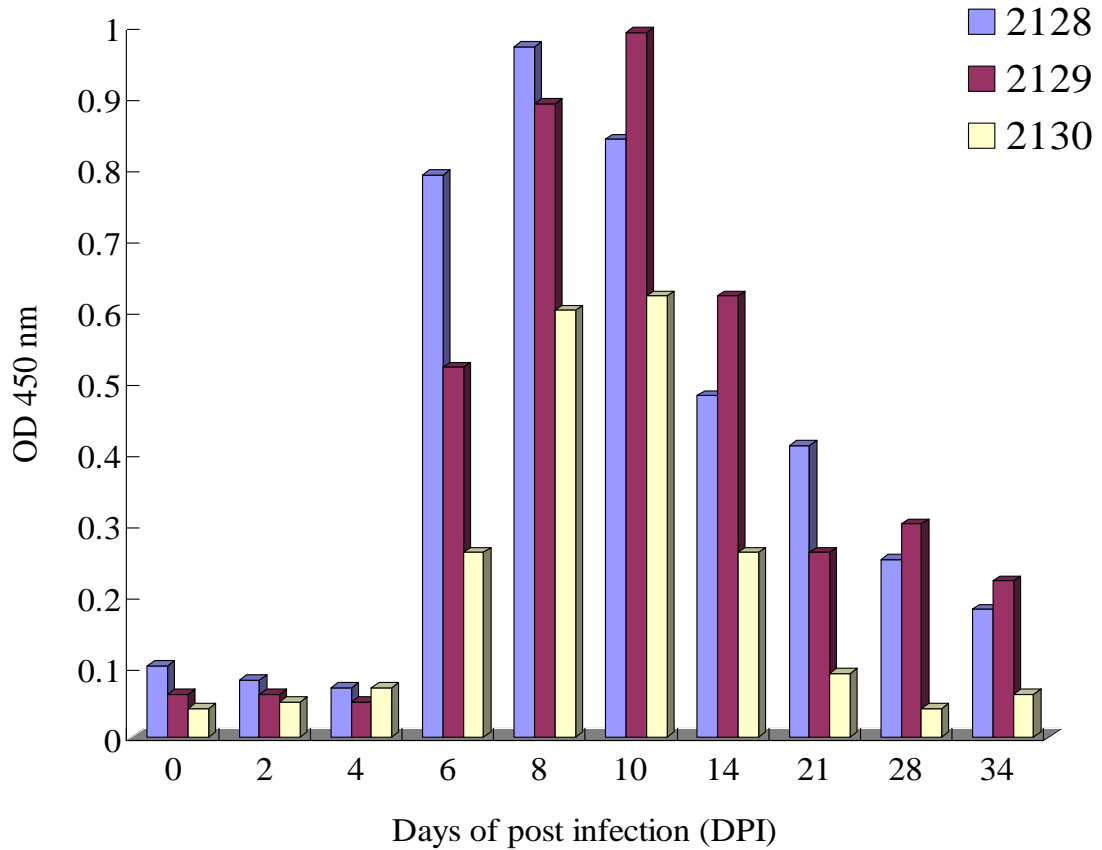


圖 11、以豬水疱病病毒間接型 ELISA 方法檢測 3 頭 SVDV 試驗攻毒豬之血清樣品 (2128、2129、2130)，於感染後 0、2、4、6、8、10、14、21、28、34 天 (DPI)，檢測結構性蛋白 VP1 抗體之結果，Cut off 值於 OD 450nm 0.22-0.25，陽性對照組約 1.79，陰性對照組約 0.06，Blank 約 0.04。



## 參考文獻

1. Armstrong RM, Barnett IT. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and quantification of antibodies against swine vesicular disease virus (SVDV). *J Virol Methods*. 25(1) :71-79. 1989.
2. Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol*. 74, 987-991. 2000.
3. Bergmann IE, Malirat V, Neitzert E, Beck E, Panizzutti N, Sánchez C, Falczuk A. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol*. 145(3) :473-89. 2000.
4. Bellini S, Santucci U, Zanardi G, Brocchi E, Marabelli R. Swine vesicular disease surveillance and eradication activities in Italy. *Rev Sci Tech*. 26(3) : 585-593. 2007.
5. Brocchi E, Berlinzani A, Gamba D & Desimone F. Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *Journal of Virological Methods*. 52, 155 - 167. 1995.
6. Brown F, Talbot P, Burrows R. Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to coxsackie B5 virus. *Nature (London)* . 245:315 - 316. 1973.
7. Chen SP, Lee MC, Sun YF, Cheng IC, Yang PC, Lin YL, Jong MH, Robertson ID, Edwards JR, Ellis TM. Immune responses of pigs to commercialized emulsion FMD vaccines and live virus challenge. *Vaccine*. 25, 4464-4469. 2007.
8. Chenard G, Bloemraad M, Kramps JA, Terpstra C, Dekker A. Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods*. 75:105 - 112. 1998.
9. Clavijo A, Wright P, Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J*. 167, 9 - 22. 2004.
10. Clavijo A, Zhou EM, Hole K, Galic B, Kitching P. Development and use of a biotinylated 3ABC recombinant protein in a solid-phase competitive ELISA for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*. 120, 217-227. 2004.
11. De Clercq K. Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J. Virol. Methods*. 70:7 - 18. 1998.
12. Ferris NP, Powell H, Donaldson A I. Use of pre-coated immunoplates and freeze-dried reagents for diagnosis of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods*. 19:197 - 206. 1988.
13. Gao SD, Du JZ, Chang HY, Cong GZ, Shao JJ, Lin T, Song S, Xie QG. B cell epitopes within VP1 of type O foot-and-mouth disease virus for detection of viral antibodies. *Virologia Sinica*. 2010 Feb;25(1) :18-26.
14. Guzman E, Taylor G, Charleston B, Ellis SA. Induction of a cross-reactive CD8(+) T cell response following foot-and-mouth disease virus vaccination. *J Virol*. 84(23) :12375-84. 2010.
15. Jiménez-Clavero MA, Escribano-Romero E. The N-terminal region of the VP1 protein of swine vesicular disease virus contains a neutralization site that arises upon cell attachment and is involved in viral entry. *J. Virol*. 75(2) : 1044-1047. 2001.
16. Lin F, Kitching RP. Swine vesicular disease: an overview. *Vet J*. 160(3) :192-201. 2000.
17. Lomakina NF, Fallacara F, Pacciarini M, Amadori M, Lomakin A I, Timina A M, Shcherbakova LO, Drygin VV. Application of

- universal primers for identification of foot-and-mouth disease virus and swine vesicular disease virus by PCR and PCR-ELISA. Arch. Virol. 149:1155 - 1170. 2004.
18. Lubroth J, Rodriguez L, Dekker A. Vesicular Diseases. In: Diseases of Swine. 9th edn. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Alaire and D. J. Taylor. Ninth Edition. Chapter 31. pp. 517-535. Blackwell, Publishing, Ames, IA. 2006.
19. Ma L, Liu YS, Ding YZ, Chen HT, Zhou JH, Liu WQ, Wang M, Zhang J. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies against FMDV serotype O with synthetic peptide antigen. Hybridoma (Larchmt) . 29(5) :409-412. 2010.
20. World Organization for Animal Health (OIE) . Chapter 2.1.5. Foot and mouth disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. OIE, France, 2012.
21. World Organization for Animal Health (OIE) . Chapter 2.8.9. Swine vesicular disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. OIE, Paris, France, 2013.
22. World Organization for Animal Health (OIE) . Chapter 2.1.19. Vesicular stomatitis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. OIE, Paris, France, 2008.
23. Xiang M, Zhang K, Lu S, Cai L, Luo Y, Zhang J, He H, Wang Q, Wu B. Preparation of monoclonal antibodies against VP2 protein of Asia I type foot-and-mouth disease virus and establishment of a competitive ELISA for the detection of antibodies. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 24(9) :1664-1669. 2008.
24. Yang M, Holland H, Clavijo A. Production of monoclonal antibodies against whole virus particles of foot-and-mouth disease virus serotype O and A and their potential use in quantification of intact virus for vaccine manufacture. Vaccine. 26 (27-28) :3377-3382. 2008.
25. Yang S, Yang J, Zhang G, Wang X, Qiao S, Zhao D, Zhi Y, Li X, Xing G, Luo J, Fan J, Bao D.
26. Development of an immunochromatographic strip for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O. J Virol Methods. 165(2) :139-44. 2010.
27. Zhang ZW, Zhang YG., Wang YL, Pan L, Fang YZ, Jiang ST, Lü, JL, Zhou P. Screening and identification of B cell epitopes of structural proteins of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. Vet Microbiol. 2009.
28. Zhang G, Haydon DT, Knowles NJ, and McCauley JW. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. J. Gen. Virol. 80:639 - 651. 1999.

## Development of Indirect ELISA for Antibodies to Foot- and-Mouth Disease Virus and Swine Vesicular Disease Virus

TH Chen<sup>1,2\*</sup>, CH Pan<sup>1</sup>, F Lee<sup>1</sup>, YL Lin<sup>1</sup>, ML Wang<sup>1</sup>  
CN Shih<sup>1</sup>, HJ Tsai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup>Graduate Institute of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, National Taiwan University

**Abstract** Foot-and-mouth disease (FMD) and swine vesicular disease (SVD) are serious vesicular diseases that have devastated swine populations throughout the world. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based assays can be used to detect antibodies to structural proteins (VP1) of FMD virus O serotype. The structural protein was expressed and purified from a prokaryotic expression system. The recombinant protein was analyzed using Western blot analysis and showed an antigenicity similar to that of FMDV structure protein. Our results have revealed that the diagnostic sensitivity (DSn) and diagnostic specificity (DSp) of our ELISA using this recombinant protein were 84.1-96.7 % and 93-100 %, respectively. In addition, an indirect ELISA based on recombinant full-length VP1 of SVDV was also developed for the detection of antibodies against SVDV in pigs. The indirect ELISA could detect SVD-specific antibodies from infected pigs as early as six days post-infection with DSn and DSp of 100%. The results obtained from the indirect ELISA were 90-93% and 85-88% consistent with those from commercial ELISA kits in detecting imported SVD-negative pigs and local commercial pigs, respectively. The absence of cross-reaction to the antibodies against FMDV, SVDV, and vesicular stomatitis virus (VSV) further highlighted the assay's specificity.

**Keywords:** *foot-and-mouth disease (FMD), swine vesicular disease (SVD), structural protein (SP), antibody detection, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), virus neutralization test (VNT).*