

28-11

應用三明治式酵素結合免疫吸附法檢測 雞傳染性華氏囊病毒抗原

林榮培^{1*} 李龍湖² 謝快樂²

(1)台灣省家畜衛生試驗所

(2)國立中興大學獸醫系

利用傳染性華氏囊病毒(IBDV)單源抗體2E6或以純化病毒免疫家兔所產生之高免疫血清，以三明治式酵素結合免疫吸附法(ELISA)檢測雞隻可疑為華氏囊病之華氏囊樣本24件，結果顯示其中16件可以上述兩種方法測出IBDV抗原，剩餘8件則無法測得。利用單源抗體或兔抗IBDV高免疫血清做第一層抗體，其陽性/陰性樣本(P/N)吸光值比(OD值比)分別為7.5或6.9顯示兩種測定方法均可區別陽性或陰性樣本，且可快速診斷本病，其中以單源抗體做第一層抗體略優於家兔高免疫血清。

Key words: *Infectious bursal disease (IBD), Sandwich ELISA, IBD viral antigen detection.*

傳染性華氏囊病(簡稱IBD)係發生於年輕雞隻的高度急性傳染病。本病於1962年首先由Cosgrove [4] 報告。因在美國的delaware州Gumboro鎮首次發現，因此又名甘保羅病(Gumboro disease)。本病毒屬於雙股RNA病毒科(Birnaviridae)，核蛋白衣呈正二十面體，沒有封套[14]。臨床上有顯性和不顯性感染。發病雞隻常見肌肉出血，腎臟腫大，並有尿酸鹽沈著，華氏囊腫大或萎縮[16]。

本省於民國72年由血清學調查，顯示本病廣泛分佈全省各雞場[12]。當雞或火雞感染IBD病毒後，因病毒破壞具產生抗體能力之華氏囊細胞(B細胞)之先質細胞而引起永久性免疫機能抑制，結果失去免疫反應能力，使雞隻增加對其他病原之感受性[2]。

本病之確實診斷，必須鑑定病毒之存在，然而野外IBD病例其病毒分離相當困難[13]，且需一定之技術及較長之時間。因此，快速之診斷法有其實際之需要。病毒性疾病快速診斷方法有多種，包括螢光抗體法，電子顯微鏡法和酵素結合免疫吸附法，其中以螢光抗體法和酵素結合免疫吸附法較快，敏感性和特異性也高。本實驗係以單源抗體或以純化之病毒免疫家兔所產生之高免疫血清，利用三明治式ELISA法從野外病材中直接測定病毒抗原，以供本病快速診斷之需。

材料與方法

病毒增殖與純化。本試驗所用之IBD病毒P3009

* 抽印本索取作者

本文原載於中華民國獸醫學會雜誌18(1):25-32,1992
台灣省家畜衛生試驗所

株為李等[11]於臺灣所分離的血清型 I 病毒。雞胚胎纖維芽母細胞(CEF)於分裝時每瓶以 0.5mL (10^6 TCID₅₀/mL) 的 IBD 病毒 P3009 同時接種。置 37°C 溫箱中迴轉培養 36-48 小時。待約 80% 細胞產生 CPE 時，將病毒液冷凍解凍 3 次。以低速離心去除細胞碎片後，上清液做為粗製抗原用。IBD 病毒之純化，係參照 Lee 及 Lukert [9] 所述方法。先以 PEG-6000 濃縮病毒，再用 fluorocarbon 萃取及 CsCl 梯度平衡離心，最後將密度為 1.33g/mL 之病毒帶抽取，經 30% 蔗糖溶液離心沈澱病毒。將病毒懸浮於 TNE 緩衝液 (0.01M Tris, 0.01M NaCl, 0.001M EDTA, pH7.6) 並保存於 -70°C 備用。

融合瘤細胞培養。融合瘤細胞 2E6 株所分泌之單源抗體 (Mab) 可和 IBDV VP2 蛋白衣結合且具有中和病毒之能力 [8]。該融合瘤細胞以無血清合成培養液 SAM-101 培養 (日水出品)，於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱培養 2 天。取出培養角瓶，輕拍角瓶使細胞脫離，倒入離心管，於 4°C 以 800rpm 離心 8 分鐘。去除上清液，收集之融合瘤細胞供 BALB/c 小白鼠腹腔注射用。

ELISA 用抗體之製備

單源抗體之製備。取 6-10 週齡左右之 BALB/c 小白鼠，每隻腹腔注射 0.5mL pristane (Sigma 廠牌)，4-6 天後將前述製備之融合瘤細胞 2E6 株同樣注射於腹腔，每隻約 10^6 個細胞。約 10-14 天左右，以 20 號注射針筒抽取腹水。將腹水離心去除細胞，血球及脂肪物後，分裝於小安瓶，保存於 -70°C 備用。同時以 96 孔微量培養盤測其中和抗體力價 [10]。

免抗 IBD 病毒抗體之製備。取前述純化之 IBD 病毒 500 μ g 添加 TNE buffer 稀釋至 0.5mL 並與 0.5mL 之 Freund 完全佐劑均勻混合，分數處注射於健康家兔皮下。28 天後再以同量病毒混合 Freund 不完全佐劑補強注射，12 天後放血，收集血清，並以前述方法測其中和抗體力價。

天竺鼠抗 IBD 病毒抗體之製備。取前述純化之 IBD 病毒 250 μ g 以 TNE buffer 稀釋至 0.5mL 並

與 0.5mL 之 Freund 完全佐劑均勻混合，分數處注射於 600-700 公克重，健康良好之天竺鼠皮下，每隻天竺鼠注射 1mL。28 天後放血，收集血清，並以前述方法測其中和抗體力價。

螢光標示抗體染色。將華氏囊病材以剪刀剪開後，用夾子擠壓將華氏囊細胞擠出並於蓋玻片上做成塗抹片，待乾燥後依 Lee 及 Lukert [9] 所述方法進行螢光標示抗體染色。

決定抗天竺鼠 IgG 過氧化氫酶標示抗體適當濃度。取天竺鼠血清用 coating buffer (碳酸緩衝液, pH9.6) 系列稀釋成 100X, 200X, …… 51200X, 及 102400X 等 11 種濃度。由第二行起，依序滴加 0.05mL 於 ELISA 專用 96 孔測定盤 (Nunc 廠牌) 各行內，第一行只滴加 coating buffer 做為對照。在 37°C 搖擺作用 1 小時，或 4°C 作用一夜，以含 0.05% Tween 20 之 PBS 清洗液 (PBST) 清洗 5 次。甩乾，以筋膠填塞液 (NET buffer) blocking 後，將酵素標示抗體 (Jackson Immunoresearch Lab. Inc.) 以 ELISA 稀釋液 (PBS 500mL, Tween-20 0.25mL, phenol red solution 10mL, bovine albumin 15g, NaCl 10g, PH7.4) 系列稀釋成 1000X, 2000X, …… 32000X 及 64000X, 7 種濃度依序滴加 0.05mL 於 B-H 列孔內，A 列每孔只加 0.05mL ELISA 稀釋液做為對照組。於 37°C 感作 30 分鐘，以 PBST 清洗 5 次。再以去離子水清洗 2 次，甩乾。每孔滴加 0.05mL 的受質溶液 (O-phenylenediamine dihydrochloride, OPD 溶液)。在室溫作用 15 分鐘，最後每孔滴加 1.25M 之硫酸溶液以中止反應。再以 ELISA reader (Dynatech) 在波長 490nm 下測定其 OD 值，選用適當的酵素標示抗體稀釋倍數供試驗用。

以棋盤式力價測定方法決定單源抗體適當濃度。將單源抗體 2E6 株 (小白鼠腹水) 用碳酸緩衝液 2 倍系列稀釋 4X, 8X, …… 1023X 及 2048X, 10 種濃度。96 孔 ELISA 盤第 1 行只滴加 coating buffer 當做對照，由第 2 行起依序每孔滴加 0.05mL 於各行內，最後一行則只滴加稀釋液當做對照。在 4°C 作用一夜後，以 PBST 清洗 5 次，

甩乾。取粗製抗原以稀釋液做100倍稀釋後，由第2行起每孔滴加0.05mL。在37°C作用30分鐘後以PBST清洗5次，甩乾。取SPF雞血清，用稀釋液稀釋成25X, 50X, ……，1600X及3200X, 8種濃度。依序滴加0.05mL於A-H列各孔內。在37°C作用30分鐘。其餘步驟如上述，經ELISA Reader判讀後，選用適當的單源抗體稀釋倍數供ELISA試驗用。

以棋盤式力價測定方法決定免抗IBD抗體之適當濃度。將免抗IBDV高免血清及32倍稀釋之粗製抗原，以上述方法固定，加入，清洗，甩乾。取天竺鼠抗IBDV血清與等量胎牛血清混合，37°C作用1小時後稀釋1000倍。依序滴加0.05mL於A-H列各孔內，在37°C作用30分鐘，再以PBST清洗5次，甩乾。每孔滴加0.05mL經4000倍稀釋的免抗天竺鼠IgG過氧化氫酶標示抗體。標示抗體於稀釋前先與等量胎牛血清混合作用1小時，置37°C感作30分鐘，以PBST清洗5次，再以去離子水清洗2次，每孔加入含有30% H₂O₂之OPD液0.05mL。於室溫作用15分鐘，再以1.25M之硫酸溶液終止其反應。在490nm波長之下測其OD值，選用適當之稀釋倍數供試驗用。

以三明治式ELISA法檢測華氏囊中IBD病毒抗原。受測病材係1989年至1990中興大學獸醫系處理的疑似IBD病例之華氏囊病材。採取之華氏囊以PBS做成10倍乳劑置-70°C備用。單源抗體2E6或免抗IBDV血清分別以coating buffer稀釋成1000倍。96孔ELISA盤每孔滴加0.05mL，4°C放置一夜，清洗5次，甩乾。第一行只滴加稀釋液，第二行A孔滴加IBD陽性華氏囊10倍乳劑，B孔滴加IBD陰性SPF雞華氏囊10倍乳劑，C, D, E, F, G, 及H孔則滴加待測華氏囊10倍乳劑各0.05mL，第三行則為100倍乳劑，第四行為1000倍，第九行為空白對照，其餘類推。於37°C作用一小時，以PBST清洗5次，甩乾。其餘ELISA步驟同前所述。

結 果

病毒的增殖與純化。接種IBD病毒P3009株之雞胚細胞，於培養48小時左右，約80-90%細胞產生CPE時，以橡皮刮子刮下細胞，培養液一起收集之。於-70°C凍結解凍，取少量之細胞病毒混合液，以3000rpm離心30分鐘以去除細胞碎片，然後取上清之病毒液測定其病毒力價。結果顯示每批病毒力價均在10⁵~10⁶TCID之間。

將凍結解凍後之細胞病毒混合液，以PEG-6000濃縮，Freon抽取，蔗糖-氯化銨梯度離心後，於密度約1.33g/mL氯化銨梯度溶液中可見淡藍色之病毒帶。以5mL注射筒裝長吸引針抽取此淡藍色之病毒帶。將收取之病毒液再以TNE buffer稀釋5倍後，以130,000xg於4°C離心2小時。沈澱下來之病毒以TNE buffer懸浮後，取少部份純化之病毒液經負染色，以電子顯微鏡檢查，結果如圖1所示病毒顆粒沒有封套，外形呈六角型，為正二十面體構造，直徑約為60nm且具相當高之純度。

ELISA用抗體之製備。BALB/c小白鼠腹腔於注射融合瘤2E6株細胞10-14天，抽取腹水，離心取上清液測定抗體力價，其中和抗體力價約為1:131072左右。與濃縮IBDV抗原進行瓊脂沈降反應，結果如圖2所示，只見一條沈降線。健康家兔皮下注射純化之IBD病毒，第一次使用完全佐劑，28天後第二次免疫則使用不完全佐劑。於第二次注射後12天放血，收集血清，測其中和抗體力價為1:4096。和胎牛血清吸附後之免抗血清與濃縮IBD抗原進行瓊脂沈降反應，結果可見只有一條沈降線且與胎牛血清(FCS)之間無沈降反應產生(圖3)。600-700公克健康良好天竺鼠，皮下注射以完全佐劑混合之純化IBD病毒，28天後放血，收集血清，測其中和抗體力價，本次試驗所使用之抗體力價為1:1028，經以FCS吸附後與濃縮IBDV抗原進行瓊脂沈降反應，只出現1條沈降線(如圖3)。

三明治式ELISA法條件標準化。以天竺鼠血清分別測試抗天竺鼠IgG過氧化氫酶標示抗體或免抗IBD病毒抗體，結果分別以4000倍或1000倍為最適中之稀釋倍數。先將2倍系列稀釋

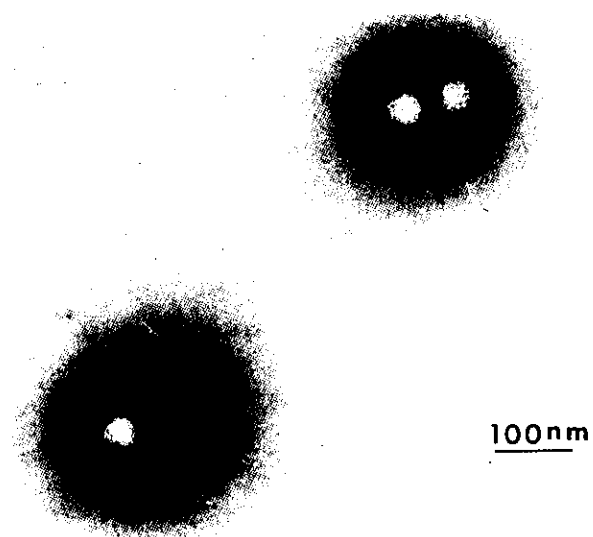


圖1 純化之IBDV顆粒在電子顯微鏡下之圖相。

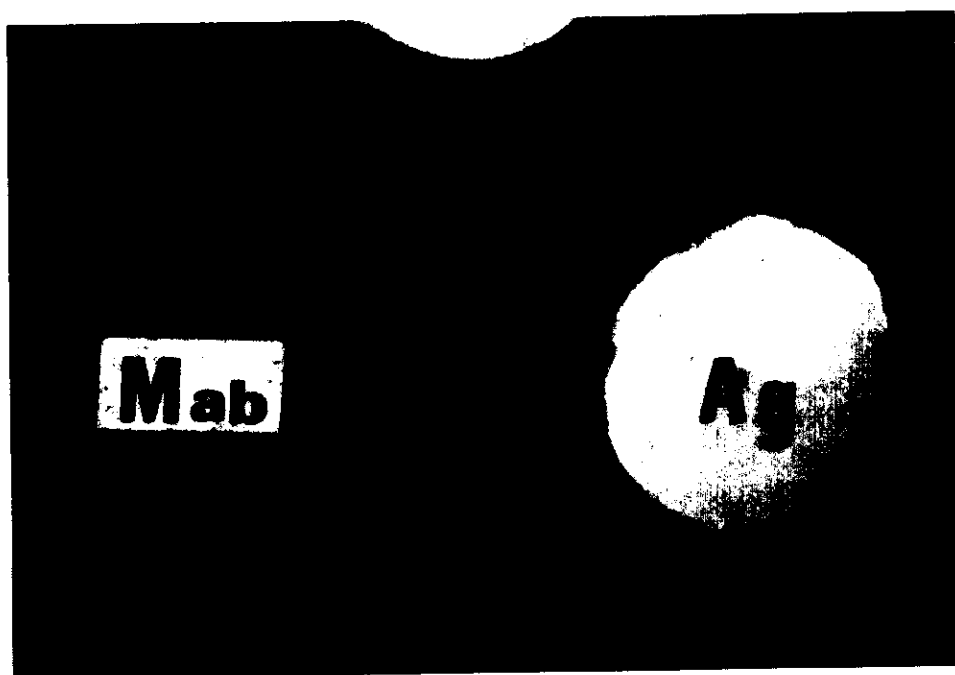


圖2 BALB/c小白鼠腹水與IBDV抗原之瓊脂沈降反應。

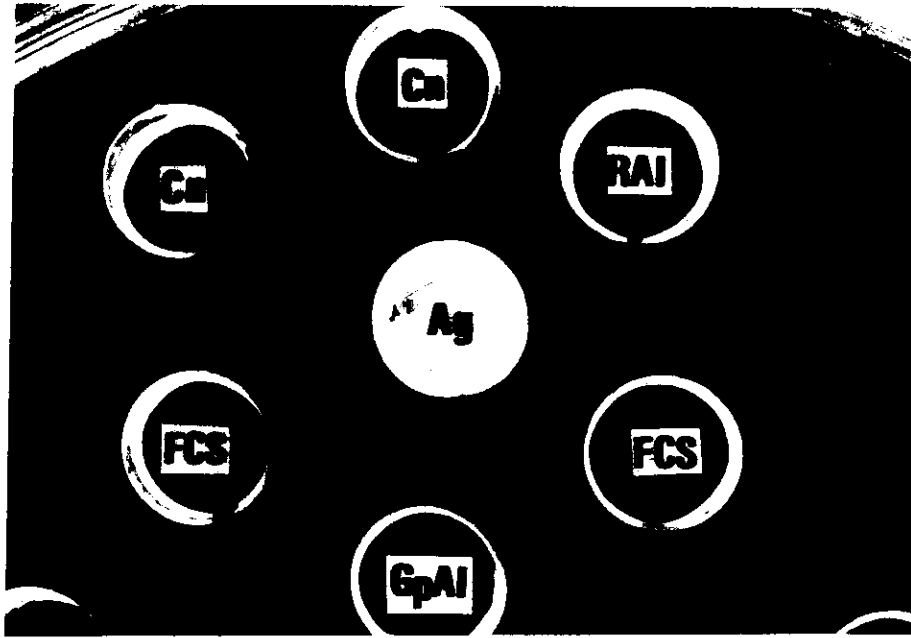


圖3 兔抗IBDV高免疫血清(RAI)，天竺鼠抗IBDV高免疫血清(GpAI)，雞血清(Cn)及胎牛血清(FCS)與IBDV抗原(Ag)之瓊脂沈降反應。

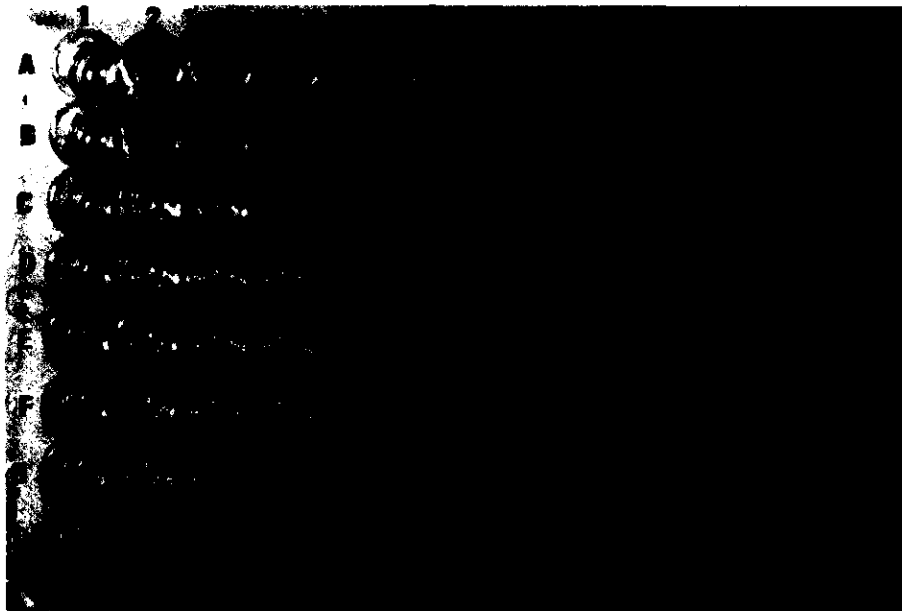


圖4 以單源抗體三明治式ELISA法檢測華氏囊病材。2, 3, 4行之A, B列為病毒對照, C, D及E, F為陰性病例, 7, 8, 9行之A, B列為陽性病例, C, D及E, F均為陽性反應。

之單源抗體被覆於ELISA盤上，吸附以適當稀釋之抗原，再以經倍數稀釋之SPF雞血清與之作用，結果顯示單源抗體於稀釋至1024倍時，其OD值即有些微之上升，2048倍即明顯上升，因此取1000倍為適當之稀釋濃度。(圖未附)。

應用三明治式ELISA法檢測雞華氏囊中IBDV抗原。以單源抗體為第一層抗體，結果於24個雞華氏囊樣本中ELISA陽性者有16例，陰性者8例(圖4)。以兔抗IBDV高免血清為第一層抗體，檢查相同之24個雞華氏囊樣本，可得相同結果。利用單源抗體為第一層抗體，來檢測華氏囊中樣本者其陽性/陰性(P/N)吸光值比(OD值比)平均比值為7.5，而應用兔抗IBDV高免血清者其P/N比值為6.9，顯然以單源抗體做第一層抗體略優於家兔高免血清如表1。另外，以螢光標示抗體染色上述24個雞華氏囊樣本，除上述8例同為陰性外，於上述16個陽性樣本中尚有4例無法染出。

表1 IBD單源抗體與家兔高免血清用於三明治式ELISA法診斷IBD病材之比較

	IBD單源抗體	家兔IBD高免血清
P/N 比值	7.5	6.9

討 論

本試驗以單源抗體或兔抗IBD病毒血清被覆於ELISA測定盤做第一層抗體，用以捕捉待測樣本中IBD病毒抗原，再進行三明治式ELISA。自24件樣本中以此二種方式均可測得16件樣本為陽性。依陽性及陰性樣本之OD值比(P/N)測定結果顯示上述二種方式均可區別陽性及陰性樣本，但以單源抗體做第一重抗體時顯然優於以兔抗IBD病毒血清做第一重抗體。因此，待測樣本先以單源抗體或兔抗IBD病毒血清處理後，均可除去非特異性反應，避免發生假陽性反應，以免免疫家兔之病毒抗原雖經純化且免疫之家兔血清再以AGP方法測定結果如圖3所示僅呈現一條沈澱線，但AGP測定法敏感度較低，為避免非特異性反應發生，在進

行野外樣本測定時，兔抗IBD病毒血清及天竺鼠抗IBD病毒血清均先以胎牛血清吸附，以減低非特異性反應[5, 7]。於16件三明治ELISA陽性樣本中有4件無法以直接螢光標示抗體染色法檢出。顯然前者較後者敏感。鄺等[1]曾以類似方法測定華氏囊中IBD病毒抗原，雖然未使用單源抗體做比較且無測定P/N比值。因此，無法得知其特異性如何，但當和其他病毒檢驗方法如以latex凝集法，CAM，CEF細胞或SPF雞接種比較，顯然敏感度較高。另外，利用螢光標示抗體染色法直接測定華氏囊中IBD病毒抗原，需要貴重儀器且無法同時測定大量病材樣本[3]，而三明治ELISA尤其以單源抗體做第一重抗體時，更可克服上述困難。事實上，上述無法以螢光標示抗體檢出之4件樣本，經以聚合酶鏈鎖反應(PCR)方法直接測定IBD病毒核酸時，均已證實為IBD病毒感染(投稿Journal of Virological Methods)。證明三明治ELISA方法之特異性極高。另外，以三明治ELISA法測定為陰性之8件樣本，再以螢光標示抗體染色法測定時也同樣均為陰性。因此，該8件樣本應為IBD病毒陰性。但目前有些IBD病毒株蛋白VP2上已被報告至少含有二種不同抗原決定基，其均能刺激雞隻產生不同且具中和病毒能力之抗體[15]。而本試驗僅使用一種單源抗體以測定病材樣本。因此，這8件陰性病材是否因採材時間較慢以致病毒抗原含量偏低，或因不同變異株感染而無法測出，仍需進一步探討。以PCR方法直接測定病材中病毒核酸，因抗溫酵素(Taq)連續作用的結果，能將原本極少量的核酸複製成至少含有 μg 的核酸，而被認為是一種特異性及敏感性均高的診斷方法[6]。上述8件陰性樣本目前正以此法進一步證實是否為IBD病毒感染。

誌 謝

本試驗承國科會補助(NSC 77-0409-B062-01)，臺灣省家畜衛生試驗所黎南榮拍攝電子顯微鏡相片及國立中興大學獸醫學研究所沈瑞鴻、賴秀芷、陳金蘭協助實驗，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. 廣懋勁、呂榮修、李龍湖、林地發、廖永剛、李全、李永林：以酵素結合免疫吸附法(ELISA)測定雞隻華氏囊內傳染性華氏囊病毒抗原。中華獸醫誌。13：265-269, 1987.
2. Allan W H, Faragher J T, Cullen G A: Immunosuppression of infections bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. *Vet Rec* 90: 511-512, 1972.
3. Allen G M, McNulty M S, Corner T J, McCracken R M, McFerran J B: Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical materials. *Avian Pathol* 13: 419-427, 1984.
4. Cosgrove A S: An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Dis* 6: 385-389, 1962.
5. Ferris N P, Dawson M: Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot and mouth and swine vesicular disease. *Vet Microbiol* 16: 201-209, 1988.
6. Guatlli J C, Gingeras T R, Darby D D: Nucleic acid amplification in vitro: Detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev* 2: 217-226, 1989.
7. Hamblin C, Barnett I T R, Hedger R S: A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J Immunol Methods* 93: 115-121, 1986.
8. Lee L H: Monoclonal antibodies against different epitopes of a 40Kd capsid protein of infectious bursal disease virus. *Proceedings of the National Science Council, Part B: Life Science* 14: 75-84, 1990.
9. Lee L H: Lukert P D: Isolation and structure of infectious bursal disease virus. *J Chin Soc Vet Sci* 12: 171-182, 1986.
10. Lee L H, Liu H J: Protection of antibodies to major capsid proteins of infectious bursal disease virus in chickens. *J Chin Soc Vet Sci* 16: 23-31, 1990.
11. Lee L H, Lu Y S, Li N J: Characterization of infectious bursal disease virus isolated in Taiwan. *J Chin Soc Vet Sci* 14: 89-100, 1988.
12. Lu Y S, Shien H K: Infectious bursal disease in Taiwan. *J Chin Soc Vet Sci* 9: 61-66, 1983.
13. McFerran J B, McNulty M S, Connor T J, McCracken R M, Collin D S, Allan G M, McKillop E R: Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, Turkeys and ducks: demonstration of second serotype. *Avian Pathol* 9: 395-404, 1980.
14. Pattison M, Alexander D H, Harkness J W: Purification and preliminary characterization of a pathogenic strain of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol* 4: 175-187, 1975.
15. Snyder D B, Lana D P, Savage P K, Yancey F S, Mengel S A, Marquardt W W: Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis* 32: 535-539, 1988.

16. Winterfield R W, Hitchner S B: Etiology of an infectious nephritisnephrosis syndrome of chicken. *Am J Vet Res* 23: 1273-1279, 1962.

A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Viral Antigens of Infectious Bursal Disease

Yung-Pei LIN^{1*}, Long-Huw LEE², and Happy K. SHIEH²

Taiwan provincial Research Institute for Animal Health, Taipei, Taiwan 25101, ROC¹ and Department of Veterinary Medicine, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 40227, ROC²

Monoclonal antibody (mAb) 2E6 against VP2 capsid protein of infectious bursal disease virus (IBDV) or rabbit anti-IBDV antiserum was initially used to capture the IBDV antigens in bursal tissue specimens followed by an enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA) for the detection of IBD infection. IBDV antigens in 16 from 24 bursal specimens could be detected. The ratio of absorbance value from IBDV-positive and -negative bursal tissues (P/N) was 7.5 when the mAb was initially used in sandwich ELISA, while that was 6.9 when rabbit anti-IBDV antiserum was used. It suggests that the sandwich ELISA following the antigen capture with both kinds of antibody could clearly differentiate the P/N (IBDV-positive and -negative bursal tissues). Moreover, the sandwich ELISA with mAb for the detection of IBDV is better than that with antiserum.

*Corresponding author

Reprinted from the *J. Chinese Soc. Vet. Sci.*

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health, Taiwan, R.O.C.