

猪水疱病免疫擴散抗原之成品化

黃金城 鍾明華 詹益波 李振宗

台灣省家畜衛生試驗所

免疫擴散測定法 (Microimmunodiffusion Test, MIDT) 具有良好的特異性, 且操作最為簡便, 故為常用的測定法之一, 猪水疱病病毒 (Swine vesicular Disease Virus, SVDV) 經過濃縮, 用為MIDT 的抗原, 可得很好的效果。

ESK細胞增殖成monolayer後, 接種0.073 Multiplicity of Infectivity (MOI) 的SVDV, 30小時後可達最高的病毒力價, 病毒液經0.003M Binary ethylenimine (BEI)不活化後, 用9% Polyethylene Glycol MW 6000 (PEG)濃縮, 最適當的抗原濃度在4.0 mg/ml ~ 2.0 mg/ml, 可診斷出4096倍~128倍的血清中和抗體, 抗原經使用20%的Lactose當媒劑於凍結乾燥後, 仍具原來相同之敏感性, 故適合以凍結乾燥成品化。

SVD早在1966年在意大利即已被發現, 病毒歸類於Enterovirus, 在猪隻雖不會造成嚴重的死亡率, 但因與其他水疱性疾疾病如水疱性口炎 (VS)、水疱疹 (VE) 及口蹄疫 (FMD) 等之臨床症狀不易區別, 故此病在許多國家都被列為惡性傳染病之一, 目前各國對於種猪的進口及屠體的污染, 都採嚴格的檢查。因此將SVD免疫擴散抗原成品化以供給本省各防治所普查是否有污染或供檢疫站做為進口種猪之摘除乃不可廢之工作。

材料與方法

1. 細胞之增殖:

採用猪胎腎細胞 (ESK), 培養液為MEM含8% FCS (胎牛血清), 1%

Hepes (1M), 1.5% NaHCO₃ (7.5%), 培養於Roller Bottle 表面積690 cm², 每瓶含100 ml 培養液, 其中細胞數分成四組, 為6.0 × 10⁷ / 100 ml, 4.0 × 10⁷ / 100 ml, 3.0 × 10⁷ / 100 ml, 2.0 × 10⁷ / 100 ml 等長成monolayer後每天計算其細胞數。

2. 病毒之增殖:

SVD病毒, 分讓自台灣省家畜衛生試驗所疫學系, 經以methyl cellulose clone 一次後, 接種於ESK-monolayer 上。

3. 病毒之增殖曲線:

採用75 cm² 的Flask 為一組, 每支分別接種1 ml, 含有10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ TCID₅₀ 的病毒後, 感作1 hr 後, 以不含血

清的MEM洗滌5次後，加入20 ml含2% FCS的MEM繼續培養，自開始感作後於1~48 hr間定時抽取微量之上清液，保存於-70°C一起測力價。

4. 病毒力價之測定：

將病毒液以10倍序列稀釋後，於96 well的plate上，每well加入50 μ l，每一稀釋階段做四個well，再加入100 μ l含有50萬個細胞的ESK細胞液，置37°C CO₂ incubator培養至72 hrs判讀病毒力價。

5. 各種處理方式對病毒力價之影響：

完全CPE後之病毒液，以以下四種方式處理：①直接離心：3000 RPM，20 min棄沉澱，保留上清液。②經Sonicated (MSE-150, 20 kc/sec) 20秒後，再以3000 RPM，20 min離心保留上清液。③經一次冷凍解凍之後，再經3000 RPM，20 min離心。④經一次凍結解凍後，經Sonicated，再以3000 RPM，20 min離心。經以上各種方式所得之上清液，測其病毒之力價。

6. 病毒液之不活化：

經步驟5所得之病毒上清液用BEI與Formalin為不活化劑，病毒液不活化前之力價為 $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml，BEI不活化劑之stock solution為將BEI泡於0.18 N的NaOH中成為0.1 M，不活化之濃度採用0.002 M，0.003 M，0.004 M三種，在37°C暖房內攪拌10小時，再加入與BEI等量等濃度之Na₂S₂O₃終止BEI作用。Formalin濃度採用0.25%，0.35%，0.45%，0.55%，分別在37°C與4°C中作用24hrs，而不活化效果之測定，乃將以BEI不活化處理之病毒液經10倍稀釋後，加至已在96 well plates內形成monolayer的ESK細胞上，50 μ l/well，每種濃度做8個well，感作1 hr後，去病毒液，以MEM洗二次，再加入含2% FCS之MEM繼續培養，並每日觀察CPE之形成，而用Formalin不活化完成之病毒液，須先用PBS透析除去Formalin。

7. 病毒之濃縮：

①PEG使用濃度之測定：病毒液之原本

力價為 $10^{9.3}$ TCID₅₀/ml，經使用6、8、10、12%之PEG6000作用4小時後，以8000 RPM 50分鐘離心，取上清液測殘留毒之力價。

②PEG作用時間之測定：病毒液之原本力價為 $1.0 \times 10^{9.0}$ TCID₅₀/ml，經加入9%PEG6000後，置於4°C中攪拌，經3、6、10、20 hrs後，各取出20 ml經8000 RPM，50 min，離心，再以5 ml的PBS溶解沉澱後，同時與含PEG的上清液測定病毒之濃縮效果與上清液之殘留力價。

8. 陽性血清之製作：

一月齡，未經其他疾病免疫的小豬，皮下接種2 ml SVD病毒液，隔兩星期後第二次接種5 ml，於放血前10天第三次接種20 ml，而分別於第一次接種後之不同時間抽血，測力價。

9. 血清中和抗體之測定 (Serum Neutralization Test · SNT)：

血清50 μ l在96 well的plates上做2倍序列等量稀釋，每個稀釋階段做二個wells，再加入等量(50 μ l)含有200 TCID₅₀的SVD病毒液，在37°C、CO₂ incubator作用90 mins後加入100 μ l的含有50萬個ESK細胞的細胞液，置37°C、CO₂ incubator中繼續培養，至72 hrs判讀。

10. 免疫擴散試驗：

(A) Agarose之製作：比較以DW和0.05 M Tris-HCl、PH7.2當Buffer、同時比較加有8% NaCl與不加NaCl之影響。Agarose (Sigma) 0.7%分別用以上之Buffer，於121°C autoclave加熱10 min後，直徑5 cm之petri dish加6 ml，直徑8.5 cm者加17 ml，厚度約為3 mm，置4°C保存，使用時以打洞器(周圍6 wells，中間1 well，well間距為3 mm，well直徑為4.5 mm)打洞，每well可滴入45 μ l的抗原或血清。

(B) 抗原成品與SVD陽性血清之測試：①製造完成的活毒抗原“BEI不活化抗原”Formalin不活化抗原(各濃縮 2×10^6)，滴於周圍wells，中間滴9048倍的抗血清。②取中和抗體力價9048倍~64倍之血清，與經2

倍序列稀釋之抗原反應。③Agarose 經用不同之 Buffer 泡製後，比較抗原，抗體反應情形。

上形成 monolayer 後計算細胞數（如表一）。從表一可得 ESK 細胞隔 5 天繼代一次，以 1 : 3 繼代，即約每支 Bottle 接入 4.0×10^7 個細胞，於 48 小時長滿，而於第四天時細胞生長可達最多量時，接種病毒。

結 果

1. 細胞的增殖：

ESK 細胞在 690 cm^2 的 Roller Bottle

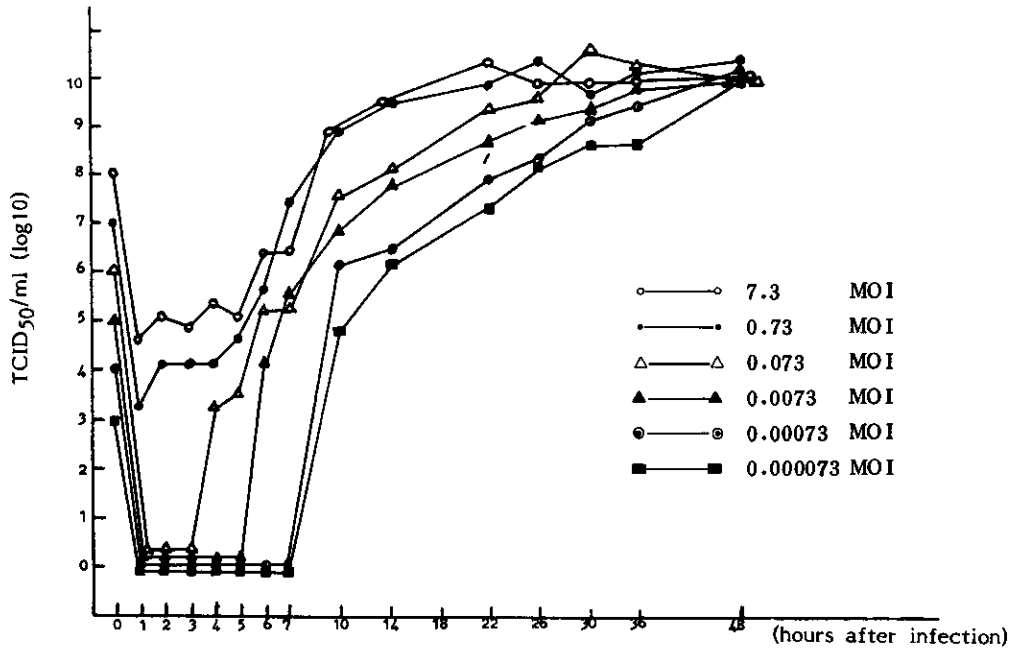
2. 病毒之增殖曲線：

接種 10^6 TCID_{50} 後第四小時有大量的增

表一 ESK 細胞在迴轉瓶內培養的增殖情形

C.N I.C.N	C.T	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
		6.0×10^7	* 6.5×10^7	9.0×10^7	12.2×10^7
4.0×10^7		* 6.0×10^7	8.1×10^7	12.0×10^7	12.1×10^7
3.0×10^7			* 6.0×10^7	8.3×10^7	12.2×10^7
2.0×10^7			* 5.5×10^7	7.9×10^7	11.9×10^7

* Total cell number of monolayer formation.
 C.T = Culture time.
 C.N = Cell number at every day.
 I.C.N = Inoculated cell number.

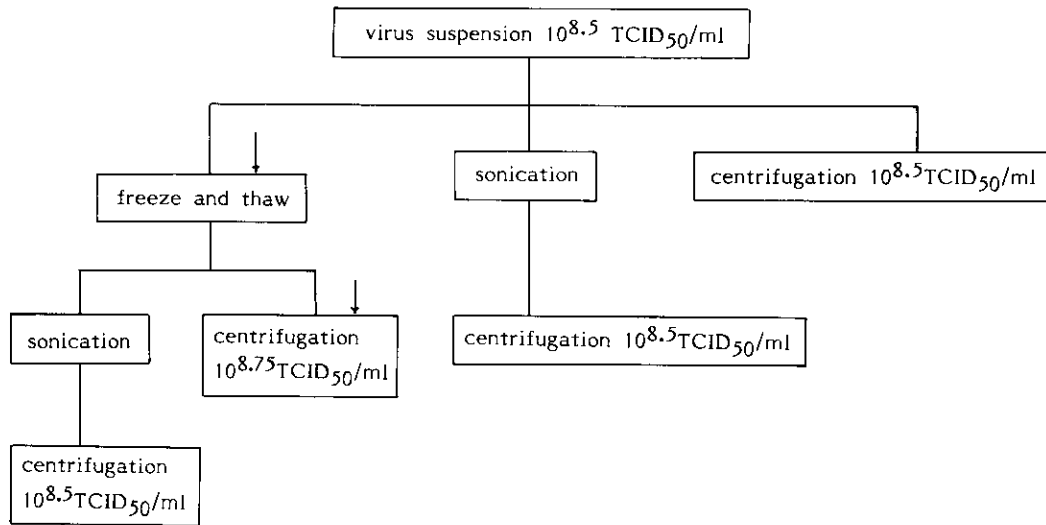


圖一 豬水疱病病毒在 ESK 細胞的增殖曲線

殖病毒釋出而接種 10^5 TCID₅₀ 則到第 6 小時才可測到病毒， 10^6 與 10^8 TCID₅₀ 則要到第七小時後才可測到病毒（如圖一），MOI 之計算：計算 control 的細胞數，平均每支 Flask 有 1.37×10^7 個細胞，接種病毒之 MOI 為： $10^8 / 1.37 \times 10^7 = 7.31$ MOI。7.3 MOI，0.73 MOI，0.073 MOI，0.0073 MOI 其病毒力價分別在 22 hrs，26 hrs 30 hrs 及超過 48 hrs 才達到最高點。

3. 病毒之增殖：

根據上項 2. 所得之 MOI，採用 0.073 MOI，於第 30 hrs 時病毒力價達最高。若每支 Roller Bottle 以 1.3×10^8 ，則 $1.3 \times 10^8 \times 0.073 = 9.49 \times 10^6$ MOI， $\frac{1.8 \times 10^8}{9.49 \times 10^6} = 20$ (dilute factor)。即種毒力價若為 1.8×10^8 TCID₅₀ / ml，則每支 Roller Bottle 須稀釋 20 倍，接種 1 ml，或稀釋



圖二 病毒液濃縮前各種處理方式對力價之影響

100 倍，接種 5 ml。另： $\frac{10^{10.6}}{1.37 \times 10^7} = 2920$ ，即每個細胞最高可產生 2920 個病毒。
4. 各種處理方式對病毒力價之影響（如圖二）

以上各方式對病毒力價均無影響，故本實驗採用病毒液 CPE 完全後直接收集置於 -70 °C 凍結，解凍，離心，去沉澱以上清液直接濃縮最為方便。

表二 B E I 對豬水疱病病毒的不活化效果

B. C	I. T				
	5 hr	7.5 hr	10 hr	12 hr	20 hr
0.002 M	* $\frac{8}{8}$ # $\frac{8}{8}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{5}{8}$	ND	ND
0.003 M	$\frac{3}{8}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$
0.004 M	ND	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$	ND	ND

ND = no do.

I. T = Inactivation time.

B. C = Binary Etylenimine concentration.

* CPE number on the ESK monolayer cells.

Inoculated case number.

5. 病毒之不活化：

①以不同濃度之 BEI 不活化，於 37 °C 攪拌作用，以 0.03 M，10 小時可達完全不活化：（如表二）

②以下不同濃度之 Formalin 分別在 4 °C 與 37 °C 中攪拌不活化，結果在 37 °C 中須以 0.45 %，經 24 小時，在 4 °C 中須以 0.55 % 經 24 小時，可完全不活化（如表三）。

表三 Formalin 對豬水疱病病毒的不活化效果

I, T F, C	reaction at 4 C			reaction at 37 C	
	19 hr	21 hr	24 hr	20 hr	24 hr
0.25 %	$\frac{8}{8}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{7}{8}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{7}{8}$
0.35 %	ND	$\frac{*7}{8}$ $\frac{\#8}{8}$	$\frac{6}{8}$	$\frac{5}{8}$	$\frac{2}{8}$
0.45 %	ND	$\frac{6}{8}$	$\frac{2}{8}$	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{8}$
0.55 %	ND	$\frac{2}{8}$	$\frac{0}{8}$	ND	ND

I, T = inactivation time.

F, C = formalin concentration

* CPE number on the ESK monolayer cells.

inoculated case number.

6. 病毒之濃縮：

①經使用 6 %、8 %、10 %、12 % 之 PEG 作用後，殘留在上清液之病毒力價為 $10^{8.0}$ ， $10^{6.5}$ ， $10^{6.5}$ ， $10^{6.5}$ ，TCID₅₀ / ml，即使用 8 %，10 %，12 %，對 SVD 病毒之濃縮有相同效果（如圖三）。

② PEG 6000 作用時間之測定：病毒力價為 $1.0 \times 10^{9.0}$ TCID₅₀ / ml，使用 9 % PEG 6000 作用，作用時間為 3、6、10、

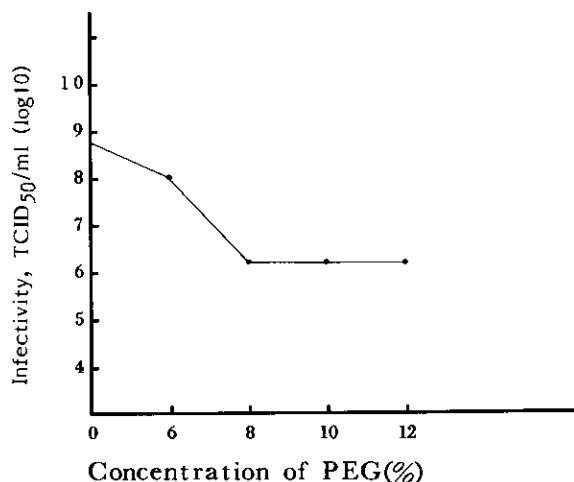
20 hrs 後，以 3 小時及 6 小時為最好，約可達 100 % 之回收率（如表四）。

7. 免疫血清之製作：

第一次免疫抗體力價可達 2⁹，第二次可達 2^{11.5}，第三次可達 2¹²，做為 IDT 之陽性對照血清（如圖四）。

8. 免疫擴散實驗：

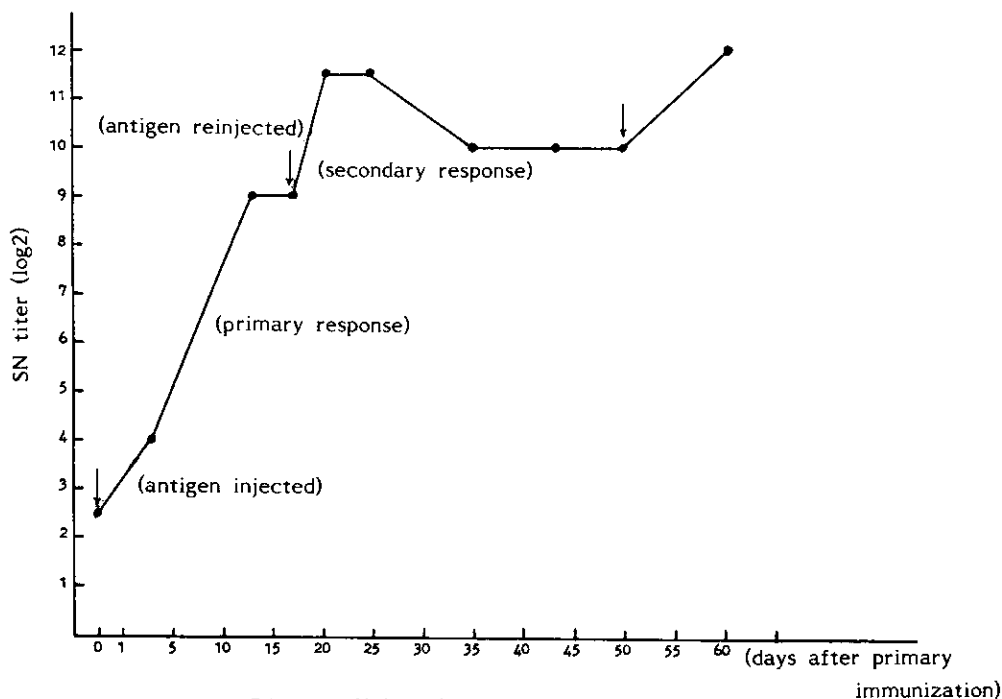
活病毒液，BEI 不活化，以 0.45 % Formalin 於 37 °C 中不活化 24 hrs 及以 0.55



圖三 不同的 Polyethylene Glycol (PEG) 濃度對豬水疱病病毒之濃縮效果

表四 9%的PEG在不同的作用時間對豬水疱病病毒的濃縮效果

PEG treatment time	Total titers(TCID ₅₀) after concentration	Total titers(TCID ₅₀) remaining in the fluid	Rate of recovery
3 hr	*10 ^{9.5} × 20 × 5 = 10 ^{10.5}	*10 ^{5.3} × 20 × 20 = 10 ^{7.9}	100 %
6 hr	10 ^{9.5} × 20 × 5 = 10 ^{10.5}	10 ^{4.8} × 20 × 20 = 10 ^{7.4}	100 %
10 hr	10 ^{7.5} × 20 × 5 = 10 ^{9.5}	10 ^{5.3} × 20 × 20 = 10 ^{7.9}	16 %
20 hr	10 ^{7.5} × 20 × 5 = 10 ^{9.5}	10 ^{4.8} × 20 × 20 = 10 ^{7.4}	16 %

* TCID₅₀ / 50μl

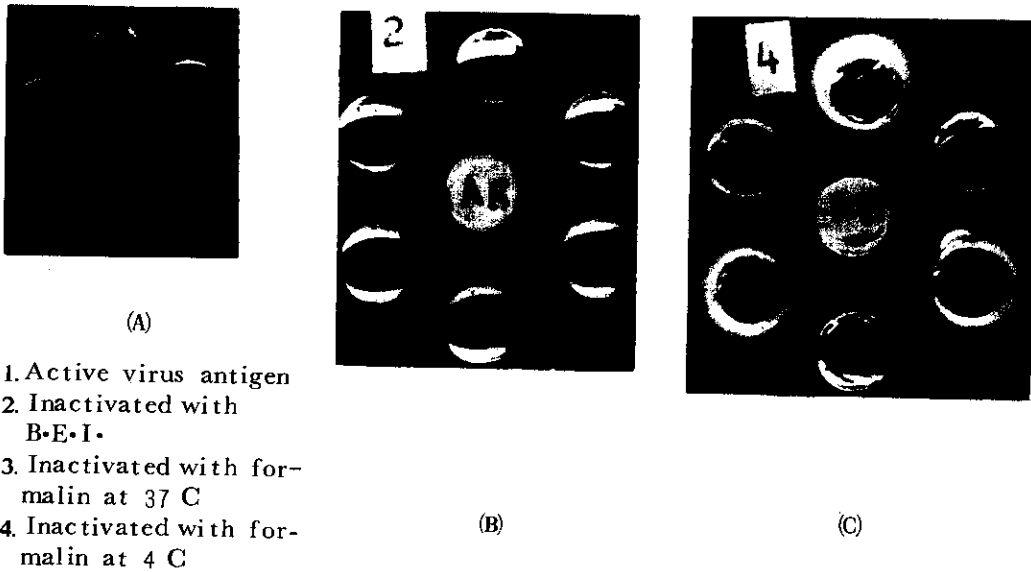
圖四 豬接種水疱病病毒後抗體的產生情形

% Formalin 於 4 °C 中不活化 24 hrs 的病毒液，分別以 9 % PEG6000 濃縮 200 倍，當抗原在 Agarose 上的反應效果一致（如圖五）唯以 Formalin 不活化之抗原經 -70 °C 凍結解凍後，有凝集塊產生，影響反應之敏感性，故本實驗只採用以 BEI 不活化之抗原。活毒抗原稀釋到 64 倍，與 256 倍中和抗體陽性血清，仍呈陽性反應（如表五）而經 BEI 不活化之抗原稀釋後，可測到 128 倍中和血清抗體（如表六），抗原濃度以 UV 260 mm 測之為 4.0 mg/ml ~ 2.0 mg/ml，可測出 9048 倍 ~ 128 倍的血清中和抗體，故成品化之抗原須被

調整以此濃度較理想（如圖六）。製作 Agarose 時，以 DW、DW - 8 % NaCl、Tris-HCl pH7.2 及 Tris-HCl pH7.2 加 0.8 % NaCl 四種 Buffer 分別泡製，結果對於反應效果並無影響，但以 DW 泡製者，於抗體 well 周圍會有乳白色的濃暈出現（如圖五(B)(C)），另使用 DW - 8 % NaCl 製成之 Agarose 質較硬，打洞後較不易吸取。

討 論

SVD 病毒屬 RNA 病毒，被歸類於 Enterovirus，為不具 envelope 之病毒，在細胞內



圖五 使用不同的不活化劑與不同的 Agarose Buffers 對結果的影響

表五 活毒抗原稀釋倍數與不同的血清力價之作用情形

A.A.D \ SN	4096 X	2048 X	1024 X	512 X	256 X	128 X	64 X
1 X	+	+	+	+	-	-	-
$\frac{1}{2}$ X	+	+	+	+	-	-	-
$\frac{1}{4}$ X	+	+	+	+	+	-	-
$\frac{1}{8}$ X	+	+	+	+	+	+	-
1	+	+	+	+	+	+	-
16 X	+	+	+	+	+	+	-
1	-	+	+	+	+	+	-
32 X	-	-	-	+	+	+	-
1	-	-	-	-	+	+	-
64 X	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
128 X	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
256 X	-	-	-	-	-	-	-

SN = Serum neutralization titers.

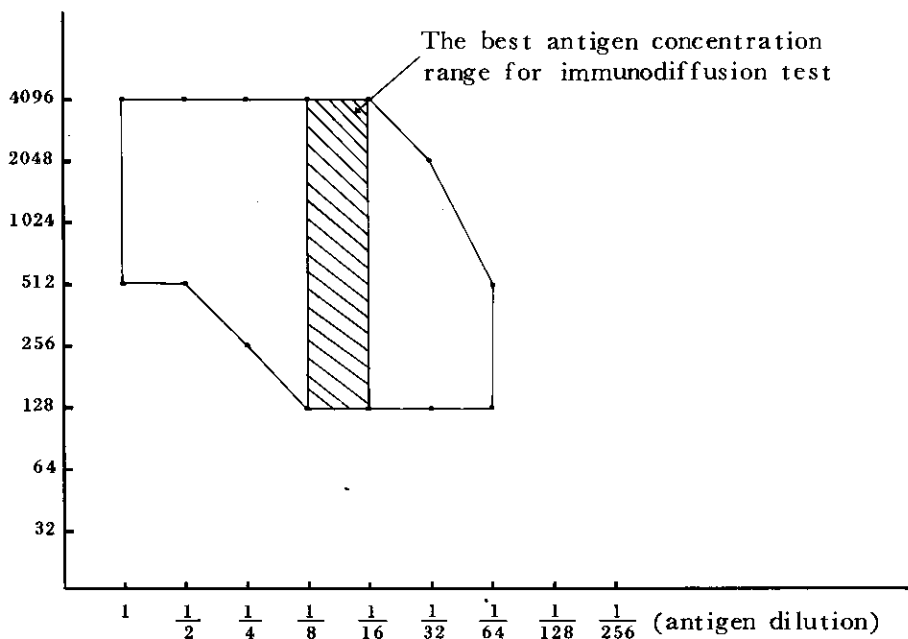
A.A.D = Active antigen dilution.

表六 用 B E I 不活化之抗原稀釋倍數與不同的血清力價作用情形

I.A.C		S N							
		4096 X	2048 X	1024 X	512 X	256 X	128 X	64 X	
1 X	31 mg/ml	+	+	+	+	-	-	-	
$\frac{1}{2}$ X	15.5	+	+	+	+	-	-	-	
$\frac{1}{4}$ X	7.8	+	+	+	+	+	-	-	
$\frac{1}{8}$ X	3.9	+	+	+	+	+	+	-	
$\frac{1}{16}$ X	1.95	+	+	+	+	+	+	-	
$\frac{1}{32}$ X	1.0	-	+	+	+	+	+	-	
$\frac{1}{64}$ X	.5	-	-	-	+	+	+	-	
$\frac{1}{128}$ X	.25	-	-	-	-	-	-	-	
$\frac{1}{256}$ X	.125	-	-	-	-	-	-	-	

SN = Serum neutralization titers.

I.A.C = BEI inactive antigen concentration



圖六 不活化抗原與血清中和抗體之作用範圍

增殖能產生CPE，然而在增殖過程中，不會使細胞膜產生具有病毒性的蛋白，待培養細胞完全出現CPE所收集之病毒液任何處理步驟均不致影響其力價。在病毒的增殖上，以7.3 MOI或0.73MOI，可在22 hrs或26 hrs達最高病毒力價，然需耗費大量的種毒，故本實驗選用0.073MOI，可在30 hrs達最高病毒力價，若使用0.073MOI以下，因病毒達最高力價需48小時以上，故不予考慮。有關病毒之不活化，BEI的使用劑量參照鍾明華⁽²⁾在假性狂犬病毒與H、G、Bahnemann⁽⁴⁾在FMD的使用濃度，但因SVD病毒在Roller Bottle上增殖，力價達 $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml，遠較Pr.V高，經實驗結果，以0.003 M，10小時才可完全將病毒不活化，而在Formalin的不活化方面，參考N. Edington⁽⁶⁾的0.25%，4℃，24 hrs，效果却不理想，甚至在37℃中濃度需0.45%，4℃中需0.55%才能於24 hrs內將病毒完全不活化，而且以Formalin不活化的病毒，經PEG 6000濃縮成抗原後，若未經透析以去除Formalin，抗原經-70℃凍結解凍後會產生protein之凝集塊而影響MIDT的作用，故不以Formalin當不活化劑。有關病毒濃縮部份，PEG 6000的使用濃度⁽²⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾，經測試結果以8%~12%有相同之效果，作用3 hrs或6 hrs均可達100%的濃縮效果，而10 hrs或隔夜，會導致病毒死亡。在免疫擴散實驗上，有關Agarose的泡製以0.5 M Tris-HCl pH7.2⁽⁸⁾泡製，柔軟度適當，較易打洞抽取。以MIDT法來檢測SVD陽性豬，雖然敏感度比其他方法為低，然而抗原經適當稀釋後，仍可測出128倍以上的中和抗體力價，足可應用於田間SVD感染豬的檢測，因為SVD田間感染豬其中和抗體通常相當高。

參考文獻

1. 陳忠松、黃天祥、何維莊、賴秀穗，1980. 豬瘟病毒與豬水疱病毒之濃縮試驗，台灣省畜衛試研報 16:17-22。
2. 鍾明華、詹益波、劉堂輝、黃金城、陳永雄，1983. 豬假性狂犬病不活化疫苗

效力試驗及其製造供應，農補報告 1-20。

3. 小山弘之、寶達勉，1981. 寒天ゲル，免疫擴散法に用い子牛白血病ウイルス抗原の最適力價について，日獸會誌 34:374-378。
4. H. G. Bahnemann. 1975. Binary Ethylenimine as an Inactivant for Foot-and-Mouth Disease Virus and its Application for Vaccine Production. Archives of Virology. 47:47-56.
5. Kaoru Sakaki, Pinit Suphavitai. 1978. Indirect Complement Fixation Test with Foot-and-Mouth Disease Virus antigen concentrated by Polyethylene Glycol precipitation. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 18: 8-17.
6. N. Edington and W. Plowright. 1980. The protection of rabbits against the herpesvirus of malignant catarrhal fever by inactivated vaccines. Research in Veterinary Science. 28: 384-386.
7. Takaaki Sugimure and Yoshio Tanaka. 1978. The Use of Polyethylene Glycol in Concentration and Purification of Several Bovine Viruses. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 18: 53-57.

Studies in the Production of Swine Vesicular Disease Antigen for a Microimmunodiffusion Test

C. C. Huang M. H. Jong I. P. Chan C. T. Lee

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The Microimmunodiffusion Test (MIDT) is an accurate, economical and sensitive diagnostic test for the detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) antibodies in swine sera. The inactivated antigen was tried to commercialize.

The ESK cell strain was used to propagate SVDV for antigen production. Monolayers were inoculated with 0.073 Multiplicity of Infectivity (MOI) of SVDV. The cytopathic effect (CPE) in the cell cultures were almost completed after 30 hrs, and the virus titer was the highest. Viral antigen was inactivated with 0.002M. Binary Ethylenimine (BEI), and concentrated with 9% Polyethylene Glycol MW 6000(PEG).

The sensitivity of MIDT was compared with the microtitration procedure of the Serum Neutralization Test (SNT). The optimal antigen concentration was 4.0mg/ml to 2.0mg/ml. Sera that had SN titers of 128 were all positive by the MIDT.