

24-19

以酵素結合免疫吸附法測定鵝病毒性腸炎抗體

鄭懋勁 蔡向榮 呂榮修 費昌勇
李永林 林地發 李 全

台灣省家畜衛生試驗所

以鵝小病毒粗製抗原進行間接酵素結合免疫吸附法 (indirect ELISA) 結果發現以血清 1 : 100 倍稀釋，免抗鵝 IgG 10 μ g / ml 濃度，酵素標示抗體 1 : 500 倍稀釋，酵素受質感作 30 分鐘時可得到最佳之結果。評估鵝病毒性腸炎活毒及不活化疫苗接種後抗體之產生，發現兩種疫苗皆能激發良好之抗體反應並可持續至少 8 ~ 16 週，其中活毒疫苗激發抗體產生較高且快。又調查 1981 年中壠地區 46 例鵝血清，未發現有鵝病毒性腸炎 ELISA 抗體，調查 1986 年高雄縣未接種疫苗之鵝 14 例，發現有 3 例為 ELISA 抗體陽性。比較 ELISA 及凝膠沈澱法 (AGP) 應用於鵝病毒性腸炎之抗體測定 149 例，結果 ELISA 法較 AGP 法之敏感度顯著為高，特異性亦佳。

鵝病毒性腸炎主要發生在蘇俄、匈牙利等歐洲共產國家，本省亦於 1982 年爆發蔓延全省。^(1,2) 本病於世界各國分佈不廣，研究報告有限，由於 CPE 的產生不明顯，鵝胚胎的來源不易，Gough 等⁽⁶⁾ 以正蕃鴨 (Muscovy Duck) 胚胎操作中和抗體試驗，並開發凝膠沈澱法 (Agar Gel Precipitin, AGP) 抗原作血清調查，然而前者於大量樣品時所費不貲，而後者亦有敏感性低的限制。

本試驗以間接酵素結合免疫吸附法 (indirect ELISA) 與凝膠沈澱法比較，對本省鵝病毒性腸炎爆發前後之血清調查，並對呂等⁽²⁾ 開發之活毒與不活化鵝病毒性腸炎疫苗評估。

材料與方法

一、ELISA 抗原：

使用由南投縣分離之 N 32122 株鵝小病毒⁽¹⁾ (正蕃鴨纖維芽細胞馴化)，經在正蕃鴨纖維芽細胞增殖後，以 Behrens Kärber 法計算其 TCID₅₀ 為 10^{5.5} / ml，經 3 次凍結溶解後，以 8,000 G，30 分鐘遠心所得上清液，再通過 0.45 μ m 過濾膜，即為本試驗之粗製抗原，-70 °C 保存備用。

二、不活化疫苗及活毒疫苗之研製：

依前述之方法⁽²⁾ 製造，即以 N 32122 株鵝小病毒在鵝胚胎纖維芽細胞增殖後以 0.2% 福馬林不活化，再添加 Al (OH)₃ 製成不活化疫苗，或經在鵝胚胎肝或鵝胚胎纖維芽細胞繼代

40 代減毒株經增殖後製成活毒疫苗，接種時每一劑量含有 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 病毒。

三、鵝血清：

1. 陽性血清：以前述之耐過鵝血清⁽⁹⁾ 供為陽性血清之用。

2. 陰性血清：購自雲林縣某場未接種鵝病毒性腸炎疫苗且無鵝病毒性腸炎病史之鵝胚胎，經在本實驗室孵化後飼養於隔離飼育室至 3 週齡時採血，測定其中和抗體力價為陰性後供為陰性血清之用。

3. 疫苗接種後血清：飼養於本所隔離飼育室之 3 週齡鵝 20 隻，分為 2 組各 10 隻，分別接種不活化及活毒鵝病毒性腸炎疫苗，並於接種前及接種後定期採血，測定其疫苗接種後抗體產生情形。

4. 野外血清：係 1981 年採自中壢地區鵝血清 46 隻保存於本所者及 1986 年採自高雄縣後院養殖形態並且未接種鵝病毒性腸炎疫苗之 6 戶農家 14 隻鵝血清。

四、兔抗鵝 IgG：

鵝血清以 33 % 飽和濃度之硫酸銨沈澱 3 次，經過透析後再以 Sepharose CL-4B (Pharmacia) 膠體過濾 (gel filtration)，取得 IgG 段，並以 Biuret 法測定其濃度。

兔之免疫法按 Johnstone and Thorpe⁽⁶⁾ 之方法進行，第一次用 500 μ g 鵝 IgG 與 Freund 完全佐劑混合接種，隔 10 天再以 1 mg 鵝 IgG 泡於 PBS 免疫，製得 AGP 抗體力價 32 倍之免疫血清，以上文所提之方法分離兔 IgG 段，調整濃度成 40mg/ml，冷凍乾燥後保存備用。

五、羊抗兔過氧化酶標示抗體：

係由日本家畜衛生試驗場橫溝祐一博士分讓。

六、ELISA 法實施：

最適當的血清初次抗體濃度，兔抗鵝 IgG 濃度及羊抗兔過氧化酶標示抗體濃度，係以棋盤式力價測定法 (checkerboard titration) 決定，並以此濃度測定樣品血清之 ELISA 抗體力價，其步驟主要參考 Yokomizo 等⁽¹⁰⁾ 方法實施：

1. 將製備之鵝小病毒粗製抗原以每孔 100

μ l 之劑量加入 96 孔之免疫酵素力價盤 (Nunc-Immuplate II, Inter-Med Co.)，在 4°C 過夜吸附後，以含 0.05 % Tween 80 的 PBS (PBST, pH7.2) 洗滌液每孔 300 μ l 洗滌 5 次。

2. 樣品血清以含 0.1 % Tween 80, 0.25 % gelatin, 1 M NaCl 之 0.1 M NaH₂PO₄ 溶液 (ELISA 稀釋液, pH7.2) 稀釋後，每孔加入 100 μ l 的稀釋血清，在室溫感作 30 分鐘，再以 PBST 洗滌 4 次。

3. 加入以 ELISA 稀釋液稀釋之兔抗鵝 IgG，每孔 100 μ l，在室溫感作 30 分鐘，再以 4°C 感作 1 小時後，以 PBST 洗滌 4 次。

4. 加入以 ELISA 稀釋液稀釋之羊抗兔過氧化酶標示抗體每孔 100 μ l，於 4°C 過夜感作後以 PBST 洗滌 5 次。

5. 加入每 100 ml citrate-phosphate buffer (pH5.0) 含 40mg O-phenylenediamine 及 20 μ l 30 % H₂O₂ 之酵素受質液，每孔 50 μ l，經 30 分鐘暗室感作後，每孔加入 50 μ l 之 3N 硫酸中止反應。

6. 以 ELISA 判讀機 (Microplate Reader, MR 600, Dynatech Co.) 在 490 nm 之波長判讀。

七、ELISA 陽性判定：

依蕭氏⁽⁹⁾ 以陰性血清 OD 平均值加上 3 倍標準偏差 (Standard Deviation, SD) 定為本試驗 ELISA 陽性閾值。

八、鵝小病毒 AGP 法之抗原與實施：

AGP 抗原之製備依 Gough⁽⁶⁾ 法略加修改實施，以 N 32122 株鵝小病毒接種於 10 日齡正蕃鴨胚胎之尿囊腔，經 6~8 天胚胎死亡後收集羊膜尿囊液 (Amnio-allantoic fluid, AAF) 及鴨胚胎，將鴨胚胎去除頭及四肢後，以 20 % (W/V) 懸浮於 AAF 中，經過均質化 (homogenisation) 後與等量之 trichlorotrifluoroethane (Merck 公司) 混合 30 分鐘，再以 8,000 G 遠心 30 分鐘，取水層上清液以 45 % 飽和硫酸銨沈澱，將沈澱物以 PBS 溶解，透析後還原成 5 % 供為 AGP 法抗原。

AGP 用瓊脂為含 1 % Ionagar No. 2 (

Difco)，8%NaCl 溶液 (pH7.8)，AGP 法之操作以中央一孔 (直徑 4 mm) 置抗原，周圍 6 孔 (與中央孔距離 6 mm) 置供檢血清，在 37°C 感作 24 小時後判定。

結 果

以棋盤式力價測定結果得到樣品血清 100 倍稀釋，兔抗鵝 IgG 10 μ g/ml，過氧化酶標示抗體 500 倍稀釋，酵素受質液 30 分鐘感作為最適宜之 ELISA 反應濃度與時間。

在 20 隻鵝病毒性腸炎陰性血清中，所測得之 OD (Optical Density) 值介於 0.135 ~ 0.337 之間，其 OD 平均值為 0.227，SD 為 0.069，以陰性血清 OD 平均值加上 3 倍 SD，得到本試驗鵝病毒性腸炎 ELISA 抗體陽性之 OD 閾值為 0.434。

以鵝病毒性腸炎活毒疫苗及不活化疫苗接種後 1 週即可測得陽性之 ELISA 抗體 (表 1)，其 OD 平均值分別為 0.853 與 0.506，兩者並分別於 3 週、4 週達到 ELISA 抗體高峯 (圖 1，圖 2)，其前者 OD 平均值為 1.251，後者為 1.031，且兩者之 ELISA 陽性抗體至少可持續 8 ~ 16 週之久。以鵝病毒性腸炎活毒疫苗接種後 1 週即可測得相當高之 AGP 抗體 (表 2)，並可於 4 週達到高峯，而不活化疫苗接種組，其 AGP 抗體於 1 週即達高峯 (表 3)，並呈緩慢下降。

以 ELISA 及 AGP 法調查 1981 年中壠地區之肉鵝血清 26 隻，種鵝血清 20 隻，結果均為鵝病毒性腸炎抗體陰性 (表 4)，而同法調查 1986 年高雄縣後院養殖形態 6 戶農家 14 隻肉鵝，其中鵝病毒性腸炎 ELISA 抗體陽性

Table 1. Development of Serological OD Values after Inactivated and Attenuated Goose Parvovirus Vaccination

Weeks after Vaccination	Inactivated Vaccine		Attenuated Vaccine	
	Mean OD	SD ^a	Mean OD	SD
0	0.212	0.080	0.242	0.063
1	0.506	0.095	0.853	0.242
2	0.739	0.202	0.988	0.237
3	0.954	0.286	1.251	0.122
4	1.031	0.321	1.034	0.298
8	0.812	0.130	NT ^b	NT
12	NT	NT	1.070	0.221
16	NT	NT	0.986	0.358

a : Standard Deviation

b : Not Test

者 2 戶 3 例，而 AGP 抗體陽性者僅 1 戶 1 例

在所有 149 例鵝血清中，比較 ELISA 與 AGP 法對鵝病毒性腸炎抗體之測定 (表 5)，結果一致者 131 例 (陽性一致者 64 例，陰性一致者 67 例)，而 ELISA 陽性，AGP 陰性者 16 例，AGP 陽性 ELISA 陰性者 2 例。

討 論

鵝病毒性腸炎過去的報告^(1,6)均以中和試驗評估抗體力價，本試驗將近年來頗受重視的 ELISA 法應用於本病之診斷，結果證實 ELISA 法可成為鵝病毒性腸炎的一個快速且

敏感的血清診斷方法。

前人的研究以純化的病毒做為 ELISA 抗原較多，但亦有數篇未純化病毒優於純化病毒之報告。^(4,5,7) 由於純化病毒非一般實驗室所能進行及純化過程中可能造成可溶性抗原的損失，本試驗採用粗製抗原進行 ELISA 法，同時在 ELISA 稀釋液中添加 gelatin，提高 NaCl 及 Tween 80 之濃度，以減低非特異性反應，亦可得到令人滿意的結果。

評估鵝病毒性腸炎活毒及不活化疫苗，其 ELISA 抗體至少可持續 8 ~ 16 週，並且以活

Table 2. Agar Gel Precipitin (AGP) Titters of Sera from Geese after Attenuated Goose Parvovirus Vaccination

Goose Number	Weeks after Vaccination					
	1	2	3	4	12	16
1	- ^a	2 ^b	3	4	4	3
2	NT ^c	2	2	2	1	1
3	4	4	4	5	5	4
4	2	2	2	2	2	2
5	3	3	3	2	2	1
6	2	2	2	1	<1	<1
7	<1	<1	1	2	3	<1
8	3	3	3	4	3	3

a : Negative result.
 b : AGP antibody titer expressed as the log₂ of the highest dilution of serum producing a precipitin line.
 c : Not Test.

Table 3. Agar Gel Precipitin(AGP) Titters of Sera from Geese after Inactivated Goose Parvovirus Vaccination

Goose Number	Weeks after Vaccination				
	1	2	3	4	8
1	5 ^a	5	5	5	<1
2	4	2	2	<1	NT ^b
3	4	2	2	NT	NT
4	1	1	1	2	<1
5	3	2	2	NT	NT
6	5	4	3	NT	NT

a : AGP antibody titer expressed as the log₂ of the highest dilution of serum producing a precipitin line.
 b : Not Test.

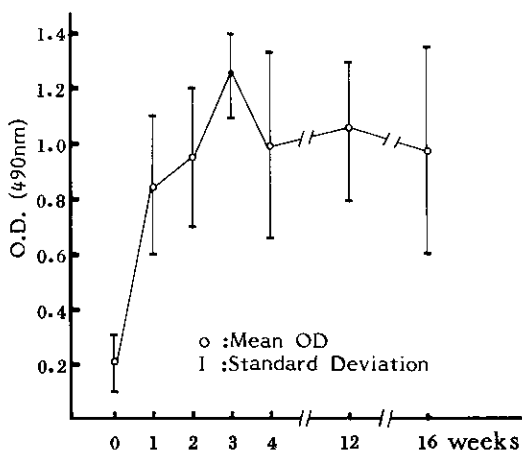


Fig. 1. Development of ELISA response after attenuated goose parvovirus vaccination.

毒疫苗產生之ELISA抗體較高且快,此與呂等⁽¹⁾報告至少有 14 週之中和抗體價結果一致,惟FLISA法與AGP法所測得之抗體反應高峯並不一致,Marquardt等⁽⁹⁾亦發現此兩抗體反應不完全一致。本試驗所測得疫苗接種後之AGP抗體可於1~4週達到高峯,而ELISA抗體則於3~4週達到高峯,由於本

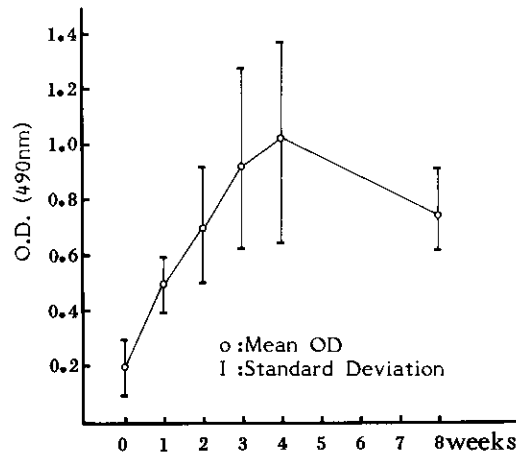


Fig. 2. Development of ELISA response after inactivated goose parvovirus vaccination.

試驗之ELISA法在測抗體之IgG,而初次免疫一般均認為IgM反應最早,是否由於IgM在AGP抗體中扮演相當重要的角色,此仍待進一步的檢討。

調查本省 1981 年及 1986 年野外鵝之血清,發現鵝病毒性腸炎之ELISA抗體與AGP抗體在 1981 年均為陰性,而在 1986 年則均為

Table 4. The Serological Investigation of Derzsy's Disease in Taiwan in 1981 and 1986

Farms	Type of Goose	Age (Weeks)	Number Investigated	ELISA		AGP	
				Positive	%	Positive	%
Chungli Area ^a							
A	Meat-type	NI ^c	26	0	0	0	0
B	Breeder	NI	20	0	0	0	0
Kaohsiung County ^b							
C	Meat-type	8	2	0	0	0	0
D	Meat-type	10	3	0	0	0	0
E	Meat-type	7	3	0	0	0	0
F	Meat-type	6	3	0	0	0	0
G	Meat-type	9	2	2	100	1	50
H	Meat-type	11	1	1	100	0	0

a : Sera collected in 1981.

b : Sera collected in 1986.

c : No Information.

Table 5. Comparison between ELISA and AGP Test for Derzsy's Disease in 149 Serum Samples

ELISA	AGP		Total
	+	-	
+	64	16	80
-	2	67	69
Total	66	83	149

Relative sensitivity = $64/66 = 97\%$

Relative specificity = $67/83 = 81\%$

% of agreement = $(64+67)/149 = 87.9\%$

陽性，此結果與張及呂等^(1,2)報告台灣於1982年首度爆發鵝病毒性腸炎相符合。

在所有149例鵝血清中，測定鵝病毒性腸炎之ELISA抗體與AGP抗體反應一致者131例，兩者之一致性 (agreement) 達87.9%，此顯示ELISA與AGP法反應結果差異不大。在鵝病毒性腸炎AGP陽性之66例中，ELISA亦為陽性者則有64例，使得ELISA對AGP之相對敏感性 (relative sensitivity) 高達97%，而AGP陽性

ELISA陰性之2例，是否由於IgG以外之免疫球蛋白參與AGP之反應，以致ELISA無法測出抗體，此待進一步檢討。在鵝病毒性腸炎AGP陰性之83例中，ELISA亦為陰性者有67例，使得ELISA對AGP之相對特異性 (relative specificity) 達81%，亦屬頗佳。

ELISA用於家禽疾病血清診斷之報告已甚多，然而至今未有用於鵝病毒性腸炎之報告。本省自1982年來，即成為本病之污染區，每年均有零星的發生，本試驗成功開發ELISA抗體調查法及對疫苗之評估，對家禽事業將有助益。

參考文獻

1. 呂榮修、李永林、林地發、蔡向榮、李全、傅祖慧。1985。鵝病毒性腸炎之控制—免疫血清與活毒疫苗之開發與應用。台灣畜牧獸醫學會會報，46：43～50。
2. 張照夫、蔡信雄、尤碧艷。1983。肆虐本省之鵝病毒性腸炎。台灣畜牧獸醫學會會報，42：37～46。
3. 蕭融終。1985。酵素結合免疫吸附法 (

- ELISA) 應用於新城雞瘟血清抗體力價之測定及單株抗體融合瘤之篩選，國立中興大學碩士論文。台中·台灣。
4. Cheng, Y.Q., L.F. Lee, E.J. Smith and R.L. Witter. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Marek's disease virus. *Avian Diseases* 28:900-911.
 5. Davidson, I., A. Aronovici, Y. Weisman and M. Malkinson. 1985. Enzyme immunoassay studies on the serological response of turkeys to hemorrhagic enteritis virus *Avian Diseases* 29:43-52.
 6. Gough, R.E. 1984. Application of the agar gel precipitin and virus neutralisation tests to the serological study of goose parvovirus. *Avian Pathology* 13:501-509.
 7. Ianconescu, M., E.J. Smith, A.M. Fadley and K. Nazerian. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hemorrhagic enteritis virus and associated antibodies. *Avian Diseases* 28:677-692.
 8. Johnstone, A. and R. Thorpe. 1982. *Immunochemistry in practice* P. 27-30.
 9. Marquardt, W.W., R.B. Johnson, W.F. Odenwald and B.A. Schlott-hober. 1980. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Diseases* 24: 375-385.
 10. Yokomizo. Y., Y. Hiroyuki and R.S. Merkal. 1985. A method for avoiding false-positive reaction in an enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 47(1):111-119.

**DETECTION OF THE ANTIBODIES AGAINST GOOSE PARVOVIRUS BY AN
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

M.J. Kwang, H.J. Tsai, Y.S. Lu, Andrew C.Y. Fei, Y.L. Lee,
D.F. Lin and C. Lee

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), used a crude antigen, was developed to detect antibodies against goose parvovirus in goose serum samples. The best result was obtained by using 1:100 diluted serum samples, 10 μ g/ml rabbit anti-goose IgG, 1:500 diluted peroxidase labelled goat anti-rabbit IgG, and by incubating the enzyme substrate for 30 min.

Evaluated by the ELISA, it was found that both the goose inoculated with the attenuated or inactivated goose parvovirus vaccine gave good antibody response, and the antibody titre could last at least 8 to 16 weeks.

Forty-six serum samples collected from Chungli area in 1981 were found negative in ELISA antibody; however, 3 out of 14 serum samples collected from Kaohsiung county in 1986 were found positive in ELISA antibody against goose parvovirus.

The ELISA was found to be more sensitive than agar gel precipitin test in detection of antibodies against goose parvovirus.