

# 出國報告（出國類別：研習）

## 口蹄疫診斷試劑之研發心得報告

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：陳姿菡 助理研究員

派赴國家：荷蘭

出國期間：中華民國 96 年 9 月 11 日起至 9 月 24 日

報告日期：中華民國 96 年 12 月 20 日

## 摘 要

此次赴荷蘭阿姆斯特丹位於 Lelystad 的 Central Institute for Animal Disease Control (CIDC) 研習期間 14 天。主要執行有關「利用重組蛋白研發口蹄疫診斷套組」等檢測方法，其中包括利用原核表現系統製成的抗原及抗體為基材所研發之豬口蹄疫非結構蛋白 (FMD-NSP) 抗體間接型 (Indirect) ELISA 方法，經 605 個血清樣品分析找出試驗標準化結果，證實特異性及敏感性分別可達 100 % 及 97.5 ~ 100 % 。且與目前常使用的商品化 ELISA 試劑套組 (A、B、C) 比較測試結果，本方法與 ELISA-A 套組統計比較得知 Kappa 值為 0.95 。另一項為牛及豬隻口蹄疫非結構蛋白抗體免疫色層分析測試片之確效試驗 (Validation)，經血清樣品測試結果證實，免疫色層分析測試片可與 O、A、C、Asia 1 等四種血清型反應。豬隻特異性試驗結果不會與豬水疱病抗血清產生交叉反應，同時亦不會與其他腸病毒之抗血清產生交叉反應。此行出國測試結果顯示，ELISA 及免疫色層分析測試片有潛力發展為診斷試劑套組，未來可提供實驗室檢診服務之診斷工具。

# 目 次

	頁碼
一、 摘要 .....	2
二、 目的 .....	4
三、 研習過程 .....	5
四、 研習心得 .....	7
五、 建議事項 .....	8
六、 致謝 .....	8
七、 圖表 .....	9

## 目 的

爲了執行本(96)年度「加強國際漁牧科技合作計畫」，從 9 月 11 日起至 9 月 24 日止搭乘長榮航空遠赴荷蘭阿姆斯特丹，飛航行程約 15 小時左右，中途經曼谷轉機，荷蘭當地與我們時差約晚 7 小時。當至荷蘭阿姆斯特丹之史基浦國際機場 (Amsterdam Airport Schiphol) 後再轉搭 50 分鐘的歐陸火車系統 (圖十三) 到達 Lelystad 的中央動物疾病控制研究所 (Central Institute for Animal Disease Control ; CIDC) (圖一)，於是展開爲期 14 天的研習之旅。此次至荷蘭研習內容包括免疫色層分析測試片之確效試驗及探討 ELISA 之抗原與抗體定量分析，及學習 ELISA 檢測法陽性和陰性 Cut-off 值之建立等標準量化分析。

荷蘭臨近於英國、德國、法國、比利時等國家，然而曾於 2001 年爆發口蹄疫，但旋即撲滅，至今仍是 OIE 所認定之「口蹄疫非疫國」。本 (2007) 年於 8-10 月間英國南部 Surrey 地區有陸續爆發牛、羊口蹄疫病例的事件，經 IAH Pirbright United Kingdom-OIE 參考實驗室以抗原及抗體 ELISA 及 RT-PCR 檢測結果証實爲口蹄疫陽性反應，此疫情頗受荷方 CIDC-Lelystad 密切的關注。然而於 CIDC-Lelystad 主要協助完成研習任務的是負責水泡性疾病實驗室計畫主持人 Aldo Dekker 博士 (圖二)，他是一位親切熱忱且資歷豐富的科學家，專長從事於口蹄疫 (FMD) 與豬水疱病 (SVD) 診斷及疫苗研發等試驗研究。2006 年本所研發的口蹄疫免疫測試片已階段性完成豬隻抗體檢測試驗，爲了進一步評估另種動物品系牛隻抗體的應用效果，本所備製將近 1,000 片牛及豬的口蹄疫免疫色層分析測試片，攜往 Lelystad 負壓實驗室 (圖三) 中分別完成各種試驗血清抗體之確效 (Validation) 試驗。

## 研 習 過 程

口蹄疫 (FMD) 為偶蹄類動物之高度傳染性疾病，主要感染的經濟動物如牛，豬和綿羊。FMD 常以發燒、水泡、嘴、舌頭，鼻孔，口鼻，腳和乳頭的上皮的腐爛等症狀為特徵。FMD 病毒是一個正股 RNA 病毒在 Picornaviridae 之成員中隸屬於 Aphthovirus 屬，為小的無封套病毒含有 8.5 kbp 基因可轉譯出結構與非結構蛋白 (NSPs)。本病毒含有 7 種血清型包括 O，A，C，Asia 1，SAT 1，SAT 2，和 SAT 3 等分佈在全世界，而每個血清型無交叉保護作用。

經試驗結果顯示，牛隻口蹄疫非結構蛋白 (NSP) 抗體免疫色層分析測試片以 POCT 定量值(RMS)之陽性平均值為  $281.6 \pm 25.7$  及陰性平均值為  $2.7 \pm 1.83$ ，二者差值為  $104.3 \pm 14.04$  倍(圖四)，從 134 支陰性血清分析 Cut off 值得知為 15(圖五)。試驗從 17 頭接種免疫牛隻 (5 頭全劑量、5 頭 1/4 劑量、5 頭 1/16 劑量及 2 頭感染動物控制組)，並以 A/Turkey/2000 病毒株攻毒後分別於第 0、10、27 天 (dpi) 收集血清樣品共 51 個，經與各種檢驗試劑 (如 ELISA-A、ELISA-B、及 ELISA-C) 比較結果，免疫色層分析測試片之敏感度性與特異性皆有 100 %，再與 ELISA-A 比較發現二者之間的一致性 (Agreement) 有 98 % (表一)。此為部份試驗，其他試驗則需進一步證實分析。

豬隻口蹄疫 NSP 抗體免疫色層分析測試片經定量證實陽性平均值為  $265.9 \pm 22.09$  及陰性平均值為  $0.8 \pm 1.32$ ，二者差值為  $332.4 \pm 16.7$  倍 (圖六)，Cut off 值經 80 支陰性血清之 RMS 值結果得知為 13。經多種試驗證實本免疫色層分析測試片確實有能力檢出來自口蹄疫病毒 O、A、C、Asia 1 等四種血清型感染後產生的 NSP 抗體(圖七)。其中有 26 頭豬隻以 O/NET/2001 病毒株攻毒並分別於-14、4、28 天(dpi)收集血清樣品有 77 個，與 ELISA-A 檢驗試劑比較後結果一致性 (Agreement) 有 97.4 % (圖八)。另外與 8 支 SVD 之強陽性、弱陽性、陰性等抗血清試驗結果證實免疫色層分析測試片不會與 SVD 有非特異性反應。

目前在台灣常用的 ELISA kit 有 UBI、Chekit、Ceditest 等試劑套組，它們是由 peptides 或 Baculovirus 及 *E.coli* 等系統製造而成。為了研發 ELISA kit 本實驗室應用抗原與抗體

結合的原理，自行 (In house) 研發間接型 ELISA。經 605 個血清樣品以 T/C ratio 標準化分析結果，陽性控制組 OD 平均值為  $0.86 \pm 0.13$  及陰性平均值為  $0.08 \pm 0.02$  (圖九)，而 Cut off 值為 0.22 以作為分析條件之依據。其中從 32 頭試驗感染豬隻分別於 0~34 天收集共 320 支血清樣品証實本 ELISA kit 可於第 8 天檢測到 NSP 抗體 (圖十)，另與現今使用的 ELISA kits 試驗比較發現與 ELISA-A kit (金標準) 之一致性相當高為 0.98，kappa 值為 0.95，一致性 (Agreement) 可達 97.5%，二者結果近乎一致。然而經各種陽性及陰性血清試驗証實其敏感性及特異性分別為 97.5-100%。

在荷蘭期間曾於 9 月 20 日赴 Intervet 總公司參訪 1 天，該公司位在 Boxmeer 地區，離 Lelystad 將近 2 小時車程。該公司主要生產獸醫用產品如疫苗(包括家禽畜、寵物及水產等動物疫苗)及生醫藥品等，分公司分佈於歐洲、北美、拉丁美洲、非洲、東南亞等各地。由銷售部經理親自接待參訪服務部門實驗室(圖十一、圖十二)，全程聯絡事宜相當感謝台灣分公司朱玉經理精心規劃安排。

此行至 CIDC-Lelystad 主要執行有關「利用重組蛋白研發口蹄疫診斷套組」等檢測方法，其中包括利用原核表現系統製成的抗原及抗體為基材所研發之豬口蹄疫非結構蛋白 (FMD-NSP) 抗體間接型 (Indirected) ELISA 方法，經 605 個血清樣品分析找出試驗標準化結果，證實本所研發之診斷套組之特異性及敏感性分別可達 100% 及 97.5 ~ 100%。且與目前常使用的商品化 ELISA 試劑套組 A 比較測試，結果顯示本方法與 ELISA-A 套組統計比較得知 Kappa 值為 0.95，一致性 (Agreement) 可達 97.5%，二者結果近乎完全一致。另一研習項目為牛及豬隻口蹄疫非結構蛋白抗體免疫色層分析測試片之確效試驗 (Validation)，經血清樣品測試結果證實，免疫色層分析測試片可與口蹄疫 O、A、C、Asia 1 等四種血清型反應，且不會與豬水疱病抗血清產生交叉反應，同時亦不會與其他腸病毒之抗血清產生交叉反應，特異性極高，正朝向國際水準及產業商品化之目標而努力。

## 研 習 心 得

荷蘭是一個風景優美的國家，荷蘭境內有三分之一的土地低於海平面，而靠近鹿特丹的 Alexander Polder 地區，更低於海平面 6.5 公尺之多。爲了土地與大自然抗衡，荷蘭人建造堤防，阻擋海水，並利用風車 (Wind mills) (圖十四) 產生動力將窪地的水抽乾，填海造地，另造船業也相當發達 (圖十五)，至今所見到的荷蘭是一望無際的平原，並孕育著無數的生命。

位在荷蘭北部的中央動物疾病控制研究所 (CIDC-Lelystad) 在該國兼負著重要的任務角色即當有 BSE、Foot and Mouth Disease、Classical Swine Fever、Anthrax 及 Avian Influenza 等疾病發生時須適時提供實驗室設備及專業技術以因應緊急狀況，其功能相當類似本所及我國的疾病診斷中心之宗旨。然而該所的實驗設備管制非常嚴謹，凡研究人員出入密閉式建築皆須申請通行卡方能進入，且服裝 (包括鞋、襪) 也需經洗衣部門領取後換裝進入三級負壓實驗室。在實驗室內也發現該所對試驗樣品的保存放置井然有序，如  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱及液態氮筒有固定位置擺放於地下室，可依照每台冰箱外所附的完整資料卡中在短時間內找到所需的試驗樣品。Dr. Aldo Dekker 表示他們已是通過 ISO17025 國際認可的實驗室，這裡讓我想到了我們的口蹄疫血清抗體中和試驗或許也可與該所共同完成實驗室能力試驗的比對。然而當試驗完畢後必需經過 5 分鐘熱水控制之沐浴 (Shower out) 程序方可出實驗室，並規定三天內不許至動物園、家畜禽養殖場及牛羊飼養牧場等處，以防止病原可能性的散播。

CIDC-Lelystad 在國際學術研究報告發表成果顯著，可觀察到研究人員與參與實驗工作者職掌分明且積極合作無間。然而工作與休憩時間安排僅然有序，同時也感受到他們的行事方法有則，例如加血清樣品時是先排排標示清楚而後整體加入試驗盤(管)後再整體封血清收集管(1mL)，試驗方法步驟果然簡單快速又有效率。

此次去該國覺得收穫良多，除了有學習獨立旅行的機會外，還有更多英文表達與生活體驗的機會。雖然語言有時辭不達意，但最終還是能以簡單溝通的方式克服「非母語」

障礙。相信這些不只包括試驗研習項目而已，同時也涵括了人文處事、語言溝通及個人勇氣等項目，是我們於試驗研究之外極需學習成長的課程。

## 建 議 事 項

寬列預算鼓勵研究人員出國赴先進國家實驗室研習參訪，以增廣見聞進而達到專業知識技術及研究經驗等學術交流的目的，提昇研究水準並加速科技成果商品化。

## 致 謝

本次奉派赴荷蘭研習有關口蹄疫診斷試劑之研究計畫，感謝農委會經費支助及長官們、本組鍾明華組長及疫學研究組李淑慧組長熱心提攜協助計畫推動與指導，並感謝新加坡商英特威藥品股份有限公司台灣分公司朱玉經理精心規劃安排至荷蘭總公司參訪行程，以及荷蘭商務暨投資辦事處 (Agricultural & Food Dept. (LNV-Bureau Taipei) Netherlands Trade & Investment Office) 熊昔湘小姐 (Cindy S. Hsiung) 提供有關荷蘭旅遊資訊等參考資料，另感謝台灣元生生物科技股份有限公司提供試驗材料，使本次研習任務順利圓滿達成，特此致謝。

## 圖 表



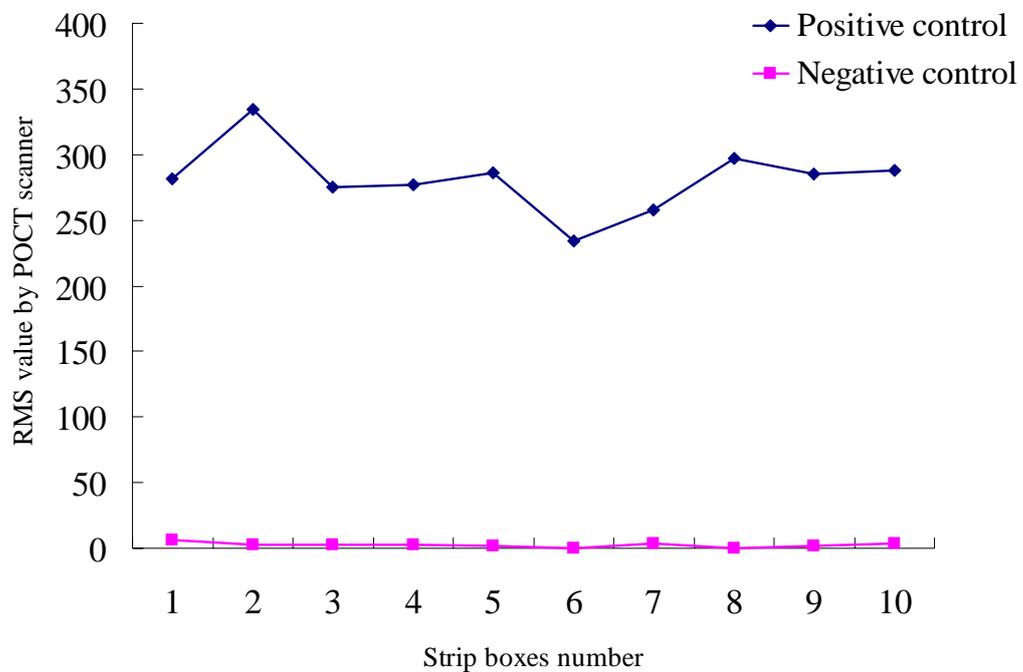
圖一、荷蘭中央動物疾病控制研究所 Central Institute for Animal Disease Control Lelystad (CIDC-Lelystad), The Netherlands。



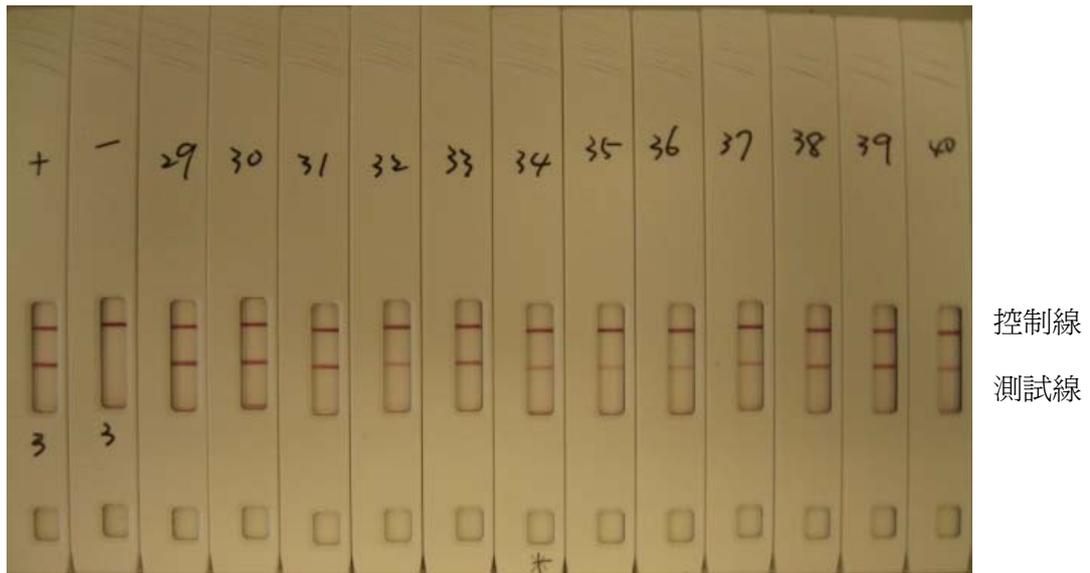
圖二、CIDC-Lelystad 負責水泡性疾病實驗室計畫主持人 Aldo Dekker 博士。



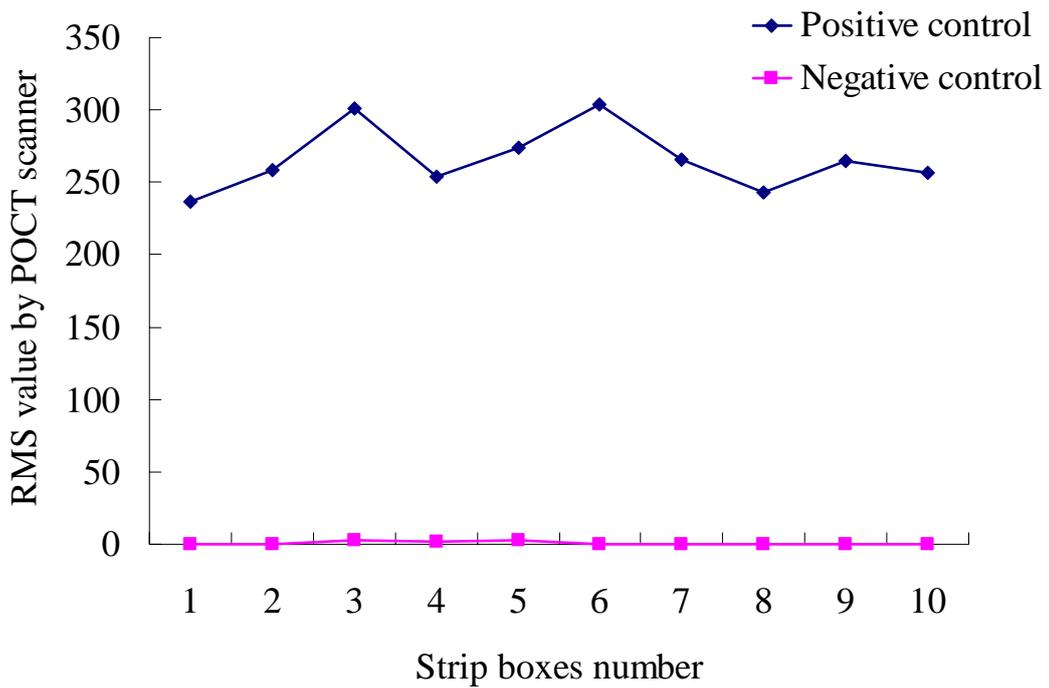
圖三、CIDC-Lelystad 負壓實驗室



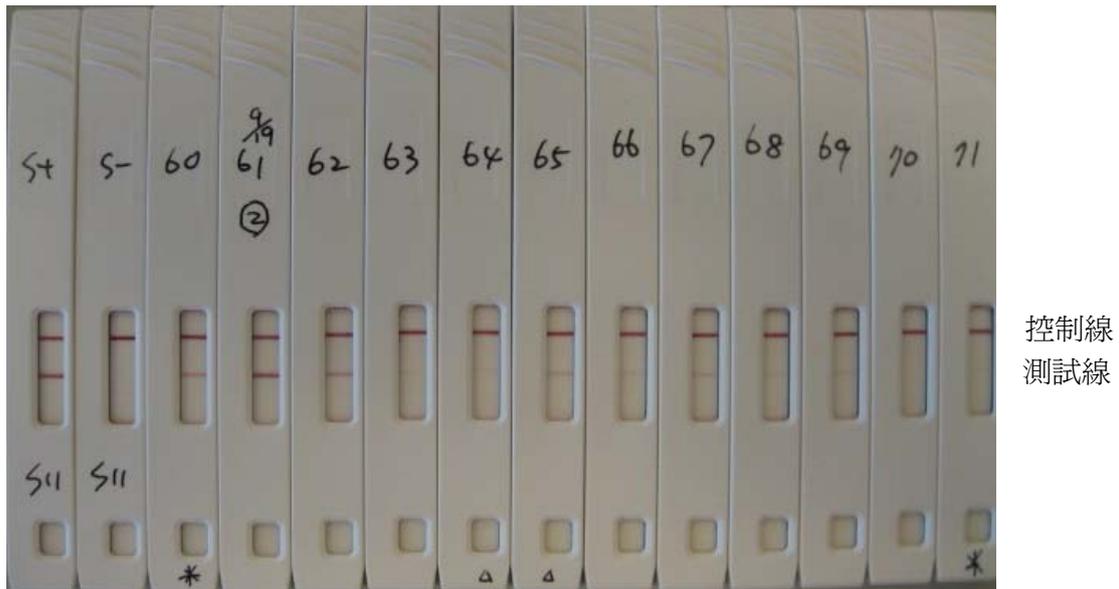
圖四、建立檢測牛隻口蹄疫非結構蛋白免疫色層分析測試片之陽性及陰性對照組。縱軸為經 POCT 檢測器掃描的讀值(單位為 RMS 值)，橫軸表示為自每盒隨機抽樣測試片的數目。深藍色三角型線表示為陽性控制組；紅色方型線表示陰性控制組。



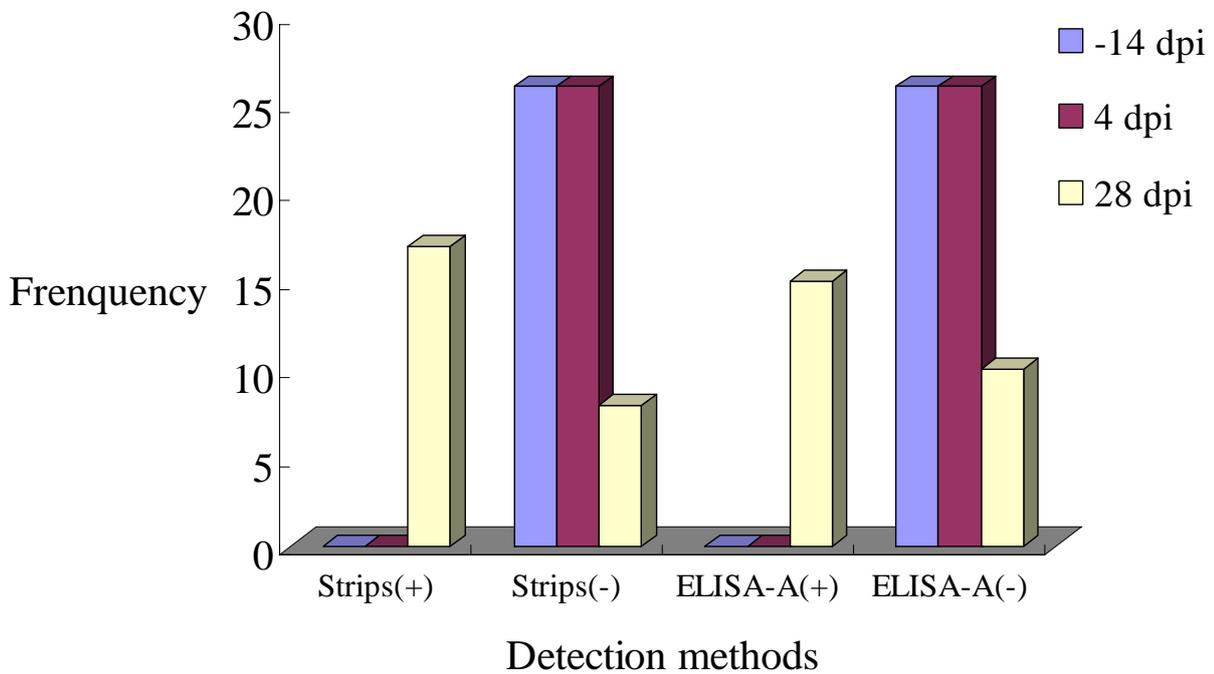
圖五、口蹄疫牛隻陽性及陰性血清以免疫色層分析測試片檢測非結構蛋白抗體之結果。



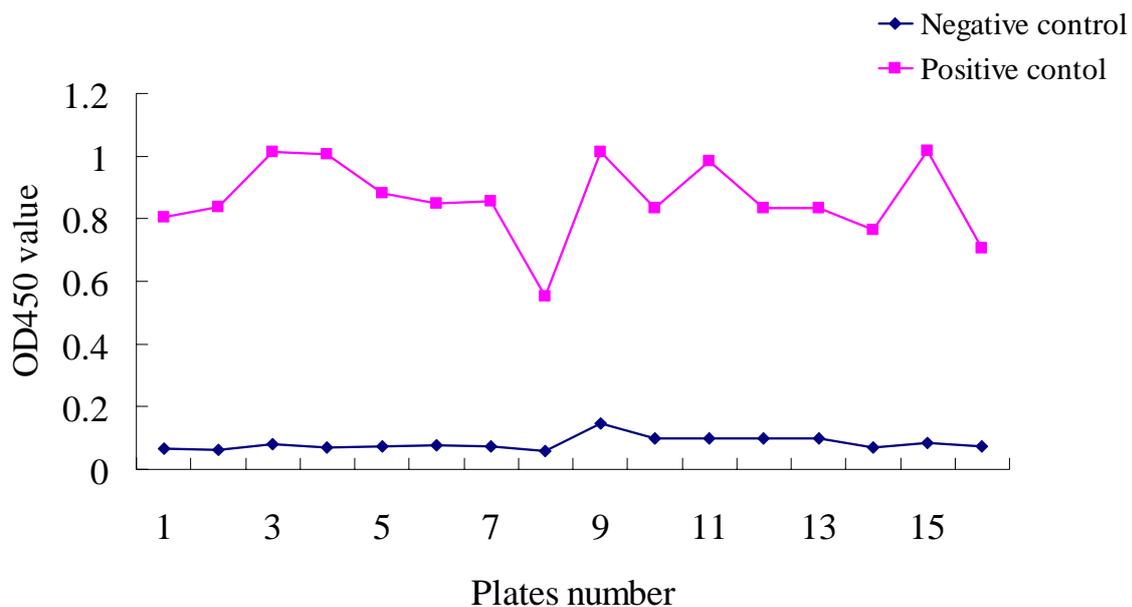
圖六、建立檢測豬隻口蹄疫非結構蛋白免疫色層分析測試片之陽性及陰性對照組。縱軸為經 POCT 檢測器掃描的讀值(單位為 RMS 值)，橫軸表示為自每盒隨機抽樣測試片的數目。深藍色三角型線表示為陽性控制組；紅色方型線表示陰性控制組。



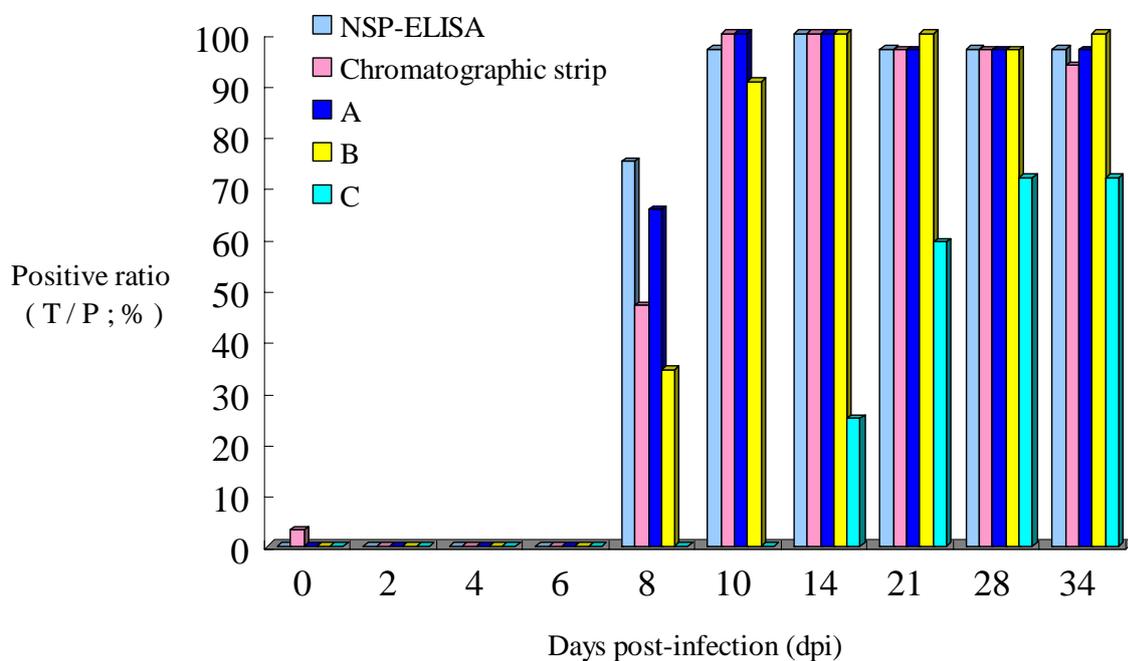
圖七、口蹄疫豬隻陽性及陰性血清以免疫色層分析測試片檢測非結構蛋白抗體之結果。



圖八、26 頭豬隻以 O/NET/2001 病毒株攻毒並分別於-14、4、28 天 (dpi) 收集血清樣品共 77 個，與 ELISA-A 檢驗試劑比較之結果。



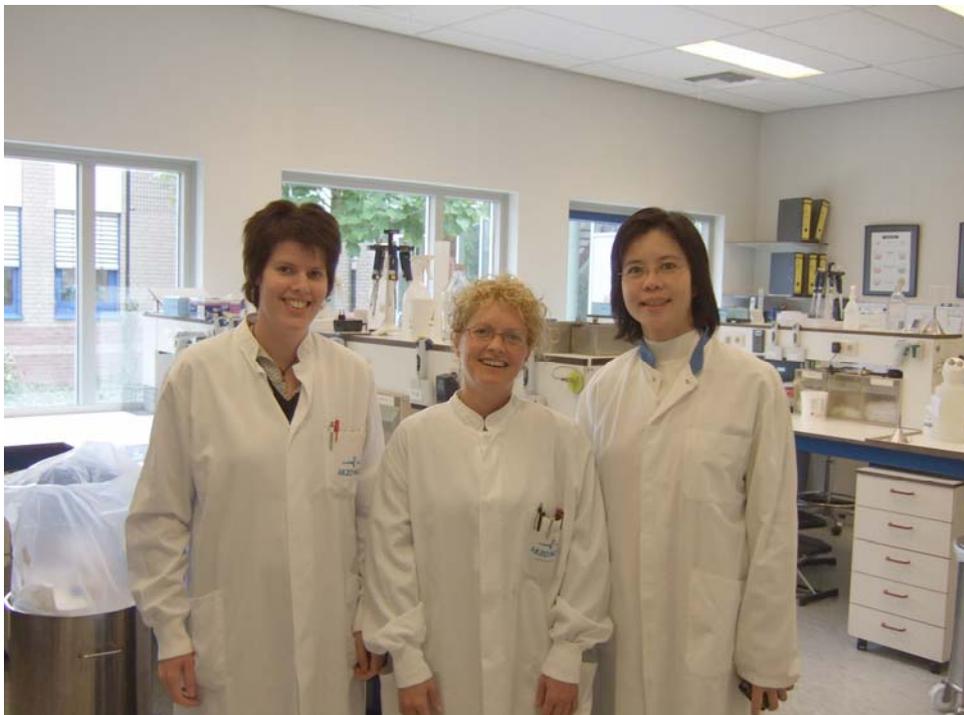
圖九、研發之間接型 ELISA 經 605 個血清樣品以 T/C ratio 標準化分析結果，陽性控制組 OD 平均值為  $0.86 \pm 0.13$  及陰性平均值為  $0.08 \pm 0.02$ 。



圖十、32 頭試驗感染豬隻分別於 0~34 天收集共 320 支血清樣品証實本研發之 ELISA kit 可於第 8 天檢測到 NSP 抗體，而於第 14 天達到最高峰，抗體出現可長達至 34 天以上。



圖十一、Intervet 荷蘭總公司銷售部經理 Dr Dorothee Paeffgen 接待參訪服務部門實驗室。



圖十二、Intervet 荷蘭總公司服務部門實驗室人員合影留念。



圖十三、荷蘭之歐陸火車系統。



圖十四、荷蘭現代化的風車。



圖十五、船博物館建構完成於 1987 年，現位在荷蘭 Leystad-Batavia stad 以供參觀。

表一、17 頭免疫之牛隻以 A/Turkey/2000 病毒株攻毒後分別於第 0、10、27 天 (dpi) 收集血清樣品共 51 個，免疫色層分析測試片與各種檢驗試劑 (ELISA-A、ELISA-B、及 ELISA-C) 測試結果之比較。

* dpv	** dpi	Strips	ELISA-A	ELISA-B	ELISA-C
28	0	0/17	1/17	1/17	1/17
38	10	17/17	17/17	15/17	16/17
55	27	17/17	16/16	17/17	17/17
Specificity (%)		100	94	94	94
Sensitivity (%)		100	100	94	97

\* Dpv: Day of post-vaccination

\*\* Dpi : Day of post-infection