

# 家禽流行性感冒之快速 檢測技術與應用

撰文/王金和

## 前言

家禽流行性感冒 (avian influenza, AI; 簡稱禽流感) 由正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*) 的 A 型流行性感冒病毒 (influenza virus type A; 簡稱流感病毒) 所引起, 主要感染禽類。病毒有 8 段負向單股 RNA, 依核蛋白質 (nucleoprotein) 或基質蛋白質 (matrix protein), 將正黏液病毒科分為 A、B、C 等 3 型, B、C 只在人發現, A 型流感廣布於人及各種動物。A 型病毒又依血球凝集抗原 (hemagglutinin, HA) 及神經胺酶抗原 (neuraminidase, NA) 的不同分為許多亞型, 目前有 16 種 HA 抗原及 9 種 NA 抗原, 2 種抗原組合在不同的病毒株中, 造成此病毒的多樣性, 可達 144 種亞型 (16×9)。在台灣, 首次於 1972 年由鴨分離到 H6N1 病毒, 而後, 低病原性禽流感病毒 (Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV) 持續感染禽類。2004 年及 2008 年分別由雞群分離出 H5N2 禽流感病毒。

檢測病毒的材料有氣管拭子、共泄腔拭子、糞便或組織乳劑。方法有病毒分離、瓊脂膠體免疫擴散法 (agar gel immunodiffusion)、血球凝集試驗 (hemagglutination test, HA test)、血球凝集抑制試驗 (hemagglutination inhibition test, HI test) 及神經胺酶抑制試驗 (neuraminidase inhibition test, NI test)。HI test 及 NI test 雖然可用於檢測病毒分離株的亞型, 但只能在實驗室操作。

最普遍檢測病毒抗原的方法為酵素免疫分析 (enzyme immunoassay), 其原理是利用待測抗原與其相對應的抗體之間專一性親合力作用, 以不同標誌物表現出待測物質的多寡, 而達到檢測目的。免疫色層分析測試片 (immunogramatographic strip) 乃將抗體固定於色層分析測試片上以檢測病毒, 應用不同的單株抗體可以檢測不同的病毒, 此法不必使用儀器, 可以在現場操作。其他尚有免疫螢光染色, 乃將螢光劑標示於抗體, 進行檢測; 將磁珠與抗體結合, 濃縮待測樣本中的病毒, 以提高檢測的靈敏度等。

檢測病毒基因的方法有反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)、即時反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time reverse transcription polymerase chain reaction)、反轉錄酶恆溫式圈環形核酸增幅法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method)、限制酶片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism)、微陣列分析 (microarray) 等等; 因其可將病毒基因增幅, 故其靈敏度較上述直接檢測樣本中抗原的方法高。

除了檢測病毒抗原及基因外, 也可以檢測抗體。檢測抗體有瓊脂膠體免疫擴散法、HI test、NI test 及酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫色層分析測試片等。

檢測病毒或抗體可分為實驗室檢測及現場檢測，實驗室需使用儀器，需時數小時至數天。現場檢測，可以當場操作，不需使用特別儀器，只要 15-30 分鐘，就可以看到結果。前者靈敏度較高，檢測也較詳細，後者靈敏度較低，為初步篩選使用。茲將目前常用的方法分述如下。

### 抗原捕捉型ELISA (antigen-capture, AC-ELISA)

抗原捕捉型 ELISA 又稱為三明治 ELISA，其作法為塗鍍抗體以為捕捉抗體 (capture antibody)，加入待測樣本抗原與之反應，再加入標示酵素的偵測抗體 (detector antibody) 與抗原結合，陽性者呈色。捕捉抗體與偵測抗體的來源動物可以是相同的或不同的種別，優點為快速、方便操作，選用不同的單株抗體可以提高靈敏度。目前有商品化的 AC-ELISA 套組用於檢測 A 型病毒抗原，乃利用抗 NP 或 M 的單株抗體檢測 A 型禽流感病毒。另外，利用亞型特異性的單株抗體發展 AC-ELISA 可用於區分病毒亞型，報告顯示已有可檢測 H5 及 H7 亞型病毒的 AC-ELISA。

一般以單株抗體作為捕捉抗體來提高特異性，台大獸醫系與生化科技系發展抗 H5 及 H6 單株抗體應用 AC-ELISA 技術檢測 H5 及 H6 禽流感病毒，發現以單株抗體作為捕捉抗體且多株抗體作為偵測抗體的靈敏度，比以多株抗體作為捕捉抗體且單株抗體作為偵測抗體來得高。

### 免疫色層分析測試片 (immunogramatographic strip) 檢測病毒

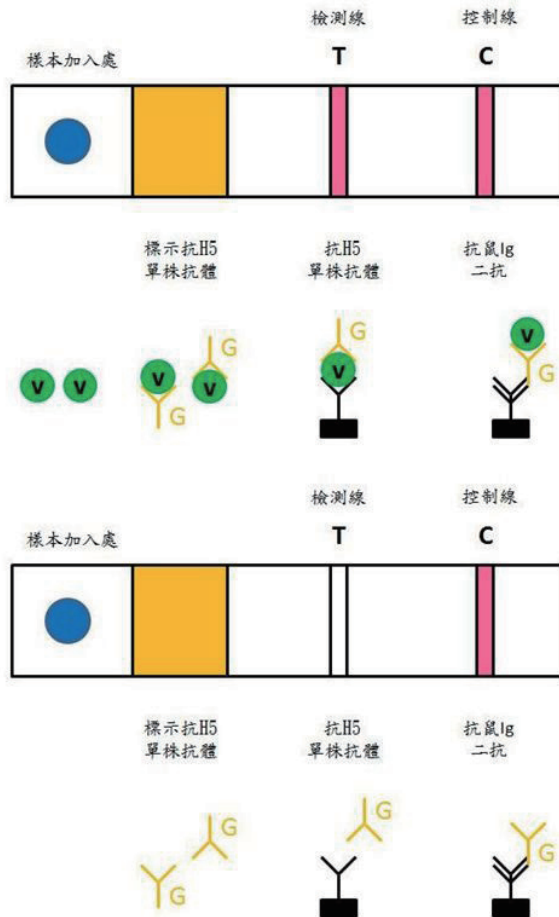
快速檢測流感技術，是現場 15-30 分鐘即可診斷，一般而言靈敏度較上述在實驗室操作 ELISA 方法低。大多數的檢測法為側流式 (lateral flow)，在檢測的操作上，只須將待測樣本或萃取液放置於試條一端的樣本墊上，即可進行檢測，一般利用標示的單株抗體，標示劑有膠體金、染劑或乳膠小球，透過毛細作用，移動並通過硝基纖維薄膜。如果有

病毒存在，病毒將與固定於硝基纖維薄膜上的單株抗體結合，可以產生肉眼可視的複合體。

目前市面上許多快速檢測流感抗原的免疫色層分析測試片，多利用對抗流感病毒 NP 或 M 蛋白質的單株抗體，以檢測流感病毒。檢測人流感用的快速檢測試劑，也可以應用於檢測禽流感病毒，因人流感與禽流感皆屬於 A 型流感病毒。人流感用的快速檢測試劑包括 Binax Now Influenza A&B、BD Directigen EZ Flu A + B、Denka Seiken Quick Ex-Flu、Fujirbio Espline Influenza A&B-N、Rockeby Influenza A antigen Test 及 Quidel Quick Vue Influenza A + B Test 等，其敏感性分別為 73%、69%、71%、67%、10% 及 67%，其特異性 Binax Now Influenza A&B 為 99%，其餘為 100% (Hurt et al., 2007)。Animal Genetics、Certest Biotech、RapiGen、Rockeby Biomed、RapiGen、Synbiotics 等公司生產的 AIV Ag Test 為快速檢測禽流感病毒試劑，專門用於禽類。這些快速篩檢試劑只能用來辨別是否為流感病毒，無法確認流感病毒的亞型，若要檢測亞型，需利用下述抗禽流感亞型抗原的單株抗體。

### 免疫色層分析測試片檢測H5亞型禽流感病毒

利用抗 H5 亞型禽流感單株抗體，可以進行亞型別的診斷，原理如圖一所示，係將標示膠體金的抗 H5 亞型禽流感單株抗體（接上膠體金等標示劑），置於樣本與檢測線之間，將抗 H5 亞型禽流感單株抗體固定於檢測線上，將抗鼠 IgG 二級抗體（或簡稱二抗）固定於控制線上。檢測時，將待測樣本置入樣本槽，若待測樣本含有 H5 亞型禽流感病毒，將與標示膠體金的抗 H5 亞型禽流感單株抗體結合，並繼續往前移動，至檢測線與固定於檢測線上抗 H5 亞型禽流感單株抗體結合而呈現陽性檢測線，剩餘結合或游離的膠體金單株抗體繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠 IgG 二級抗體



上圖為陽性。樣本中有病毒存在，往右移動，與標示膠體金的抗禽流感單株抗體結合，並繼續往前移動，至檢測線與固定於檢測線上抗禽流感單株抗體結合而呈現陽性檢測線，剩餘結合或游離的膠體金單株抗體繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠IgG二級抗體結合而呈現控制線，形成2條線。

下圖為陰性。樣本不含禽流感病毒則游離的膠體金抗禽流感單株抗體不在檢測線與抗禽流感單株抗體結合而繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠IgG二級抗體結合而呈現1條控制線；因此陽性者呈現2條線，而陰性者只呈現1條線。

**圖一 快速檢測H5亞型禽流感病毒抗原的原理**

結合而呈現控制線，形成 2 條線。若待測樣本不含 H5 亞型禽流感病毒，則游離的膠體金抗 H5 亞型禽流感單株抗體不在檢測線與抗 H5 亞型禽流感單株抗體結合而繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠 IgG 二級抗體結合而呈現 1 條控制線。因此陽性者呈現 2 條線，而陰性者只呈現 1 條線。此檢測法靈敏度達  $10^{3.5-5.5}$  EID<sub>50</sub> (Tsuda and Kida, 2007)。

應用不同的單株抗體，可以檢測不同的抗原，一個病毒含有 1,000 個 NP 蛋白質，只含有 500 個 HA 蛋白質。故上一節應用抗 NP 抗體可以檢測禽流感病毒 NP 蛋白質，其靈敏度就比本節所述檢測 H5 亞型禽流感病毒高。

### 寡核酸微陣列 (oligonucleotide microarray) 檢測病毒基因

此乃利用不同引子，以多引子 RT-PCR 增幅病毒基因片段，特異引子 5' 端標示生物素 (biotin)，增幅的 PCR 產物再與固定於薄膜上標示 streptavidin 連結鹼性磷酸酶的特異單股寡核酸探針雜交，若有特異結合，加入 BCIP/NBT 鹼性磷酸酯酶顯色試劑，會呈現陽性反應。此法已應用於區別不同亞型禽流感病毒與不同病原性的新城病病毒 (Wang *et al.*, 2008)。Hong Kong DNA Chips 公司所發的開發的 Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) 方法與此相當 (Collins *et al.*, 2002)。

其他尚有量子點螢光免疫 (quantum-dots-based fluoroimmunoassay)、石英晶體微天平 (quartz-crystal microbalance)、表面電漿共振 (surface plasmon resonance) 抗體晶片等生物感測器等方法，尚在研發階段 (Chen *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2006)。

以上敘述係為檢測病毒抗原，以下則針對檢測抗體進行介紹。

### 間接型ELISA (indirect ELISA) 檢測抗體

間接型 ELISA 常被用於抗體檢測，為最普遍的商品化檢測抗體的方式。原理是將抗原塗鍍於微量盤中，加入待測樣本與塗鍍的抗原反應，再加入標示酵素的抗體作為二抗與一抗結合，陽性者呈色。利用全病毒或 NP 表現重組蛋白質作為塗鍍抗原檢測 A 型病毒抗體，靈敏度高。間接型 ELISA 的缺點為需要純度高的塗鍍抗原，大腸桿菌表現的蛋白質，雖經純化，但成年雞隻體內常有抗大腸桿菌的

抗體，使陰性背景值偏高，且二抗具有動物別特異性，只能適用於單一種別。

塗鍍禽流感非結構蛋白質，可以檢測雞隻血清中的抗非結構蛋白質抗體，此法最大的優點為可以區別免疫或感染野毒的抗體，因為免疫死毒疫苗雞隻不會產生抗非結構蛋白質抗體，而自然感染雞隻則會產生抗非結構蛋白質抗體，此項檢測，對於使用疫苗或撲殺時進行環狀免疫的國家非常重要，由大腸桿菌表現的非結構蛋白質即可達到此目的 (邱等人, 2009)。

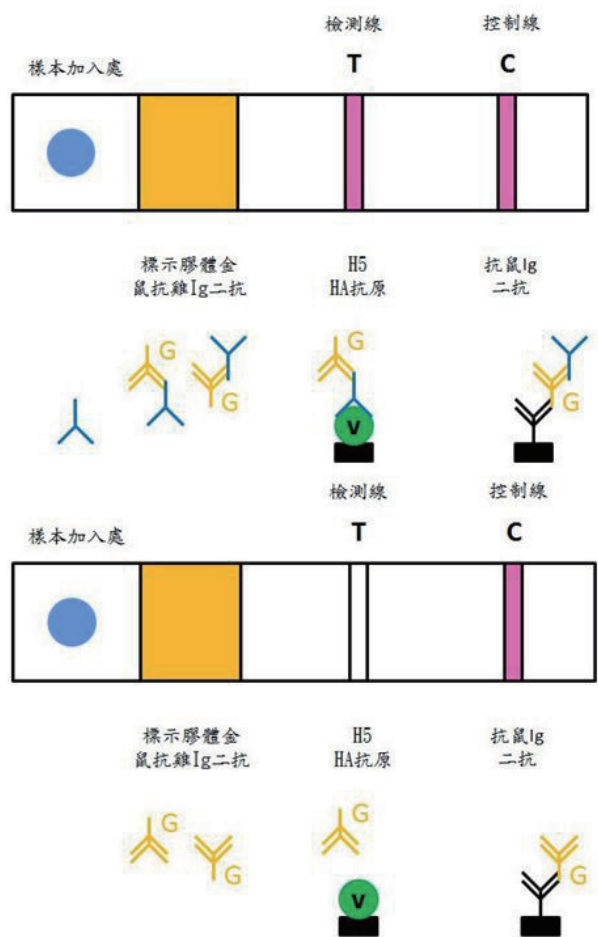
## 阻斷型ELISA (blocking ELISA) 檢測抗體亞型

於微量盤中塗鍍抗原，加入待測樣本與抗原反應，再加入標示酵素的抗體與抗原作用，結合上未與待測樣本抗體結合的抗原，待測血清中若有抗體，標示酵素的抗體無法與塗鍍的抗原結合，呈色較低，陰性血清呈色較高。此種 blocking ELISA 最大的優點為可以應用於不同種別的動物。

以 H5 專一性單株抗體發展 blocking ELISA 用於檢測 H5 亞型抗體，其敏感性與特異性分別為 98.3% 及 95.9% (Chen *et al.*, 2008 ; Chu *et al.*, 2008)。以 H6 專一性單株抗體發展 blocking ELISA 用於檢測 H6 亞型抗體，其敏感性與特異性分別為 100% 及 97% (Chen *et al.*, 2009)。

## 免疫色層分析測試片檢測H5亞型禽流感抗體

如圖二所示，將標示的抗雞 IgG 的二抗，置於樣本與檢測線之間，將 H5 HA 抗原固定於檢測線上，將抗鼠 IgG 二抗固定於控制線上。檢測時，將待測樣本置入樣本槽，若待測樣本含有抗 H5 亞型禽流感抗體，將與標示膠體金的二抗結合，並繼續往前移動，至檢測線與固定於檢測線上的 H5 抗原結合而呈現陽性檢測線，剩餘游離的膠體金二抗繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠 IgG 二抗結合而呈現控制線，形成 2 條線。若待測樣本



上圖樣本含有抗H5亞型禽流感抗體，與標示膠體金的二抗結合，並繼續往前移動，至檢測線與固定於檢測線上的H5禽流感抗原結合而呈現陽性檢測線，剩餘游離的膠體金二抗繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上抗鼠IgG二抗結合而呈現控制線，形成2條線。

下圖樣本不含H5亞型禽流感抗體，則游離的膠體金二抗，雖已結合雞血中的其他抗體，也不與固定於檢測線的H5 HA抗原結合，而繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上的抗鼠IgG二抗結合而呈現1條控制線，因此陽性者呈現2條線，而陰性者只呈現1條線。

圖二 快速檢測禽流感抗體原理

不含 H5 亞型禽流感抗體，則游離的膠體金二抗，雖已結合雞血中的其他抗體，也不與固定於檢測線的 H5 HA 抗原結合，而繼續往前移動，至控制線與固定於控制線上的抗鼠 IgG 二抗結合而呈現 1 條控制線，因此陽性者呈現 2 條線，而陰性者只呈現 1 條線。由此可見，固定於檢測線上的抗原，必須純度



及特異性甚高，才不會有非特異性反應。

應用不同的單株抗體與抗原組合，可以檢測不同的抗體，包括 H6 亞型及非結構蛋白質抗體，但尚在研發階段。

AgBIO

王金和 國立台灣大學 獸醫專業學院獸醫學系 教授

#### 參考文獻

1. Chen, L., Sheng, Z., Zhang, A., Guo, X., Lib, J., Han, H. and Jin, M. (2009) *Quantum-dots-based fluoroimmunoassay for the rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H5N1*. *Luminescence*, DOI 10.1002/bio.1167.
2. Chen, Y. C., Chen, C. H. and Wang, C. H. (2008) *Detection of H5 antibody by blocking ELISA using a monoclonal antibody*. *Avian Dis.* 52:124-129.
3. Chen, Y. T., Juang, R. H., He, J. L., Chu, W. Y. and Wang, C. H. (2009) *Detection of H6 influenza antibody by blocking enzyme-linked immunosorbent assay*. *Vet. Microbiol.* In press.
4. Chu, W. Y., Chen, Y. C. and Wang, C. H. (2008) *Clinical use of a blocking ELISA for detecting anti-H5 avian influenza antibody*. *Taiwan Vet. J.* 34:248-254.
5. Collins, R. A., Ko, L. S., So, K. L., Ellis, T., Lau, L. T. and Yu, A. C. H. (2002) *Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA*. *J. Virol. Methods* 103:213-225.
6. Huang, J. G., Lee, C. L., Lin, H. M., Chuang, T. L., Wang W. S., Juang, R. H., Wang, C. H., Lee, C. K., Lin, S. M. and Lin, C. W. (2006) *A miniaturized germanium-doped silicon dioxide-based surface plasmon resonance waveguide sensor for immunoassay detection*. *Biosensors Bioelectron.* 22:519-525.
7. Hurt, A. C., Alexander, R., Hibbert, J., Deed, N. and Barr, I. G. (2007) *Performance of six rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens*. *J. Clin. Virol.* 39:132-135.
8. Tsuda, Y. and Kida, H. (2007) *Development of an immunochromatographic kit for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection*. *Microbiol. Immunol.* 15:903-907.
9. Wang, L. C., Pan, C. H., Liu-Severinghaus, L., Liu, L. Y., Chen, C. T., Pu, C. E., Huang, D., Lir, J. T., Chin, S. C., Cheng, M. C., Lee, S. H. and Wang, C. H. (2008) *Simultaneous detection and differentiation of Newcastle disease and avian influenza viruses using oligonucleotide microarrays*. *Vet. Microbiol.* 127:217-226.
10. 邱怡昌、陳怡彤、葉修如、王金和 (2009) 檢測家禽流行性感冒病毒NS1抗體的間接型ELISA。台灣獸醫誌，35(4) (期刊印製中)。