

水產及食安利器—多功能水產快速 檢測試紙之研發

朱惠真¹、鄧晶瑩¹、陳力豪¹、曾亮瑋¹、吳豐成¹、張錦宜²

¹水產試驗所水產養殖組、²水產試驗所

前言

近年來，因為養殖管理模式不佳及環境氣候變異，導致病毒性和細菌性疾病爆發，造成水產養殖的重大虧損，其中尤以養蝦產業的損失最為慘重。2010—2013 年間，陸續於泰國、中國和越南三大產蝦國爆發養殖白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 及草蝦 (*Penaeus monodon*) 大量死亡，病蝦的病理特徵為肝胰腺異常蒼白、腸胃出現紅色病灶並呈現空腸胃狀態，好發於蝦苗放養後 7—30 天內，致死率可達 100%。後續研究將出現此一病兆之蝦病稱為「蝦類急性肝胰腺壞死病 (acute hepatopancreas necrosis disease, AHPND)」；2012 年美國亞利桑那大學 (University of Arizona) 的 Lightner 教授則指出 AHPND 的病原應是腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的特異菌株。透過分子生物學，已證實造成 AHPND 之弧菌的主要致病機制來自於菌體中的質體 (pVPA3-1)，此質體帶有能夠產生 Pir-like A (ToxA) 及 Pir-like B (ToxB) 等二種毒素蛋白質的基因，當這二種蛋白質同時存在時，即會誘發出養殖白蝦的急性肝胰臟壞死病的病徵，而造成大量死亡 (Han et al., 2015)。

腸炎弧菌除了是蝦類急性肝胰臟壞死病

的病原之外，也會造成人類的食物中毒而引發下痢。根據統計，腸炎弧菌為食物中毒的主要因素，其次才是金黃色葡萄球菌。已知下痢是由腸炎弧菌所分泌之熱敏感溶血素 (thermolabile hemolysin, TLH) 所造成，而美國食品藥品監督管理局已公告並採用 TLH 探針雜合法鑑定腸炎弧菌菌株。隨著國人飲食習慣改變、保健意識抬頭以及進出口檢驗漸趨嚴格，如何能快速且準確的判斷養殖及進口水產品有無遭病原菌感染是未來的發展方向之一，尤其臺灣四面環海，水產食物為國人重要的食物來源，更有必要開發相關的快篩試紙以因應需求。本研究旨在開發可於常溫下反應之 AHPND 及下痢病原菌快篩試紙，預期可用於養殖現場環境與生物的快速篩檢，以作為環境管理維護之依據，也可以成為食安把關的首選。

AHPND 暨下痢之多功能快篩試紙之原型開發

一、抗原及抗體製備

標準菌株來源是由國立高雄科技大學海洋生物技術系和國立臺灣海洋大學食品科學系所提供之含 pVPA3-1 質體腸炎弧菌菌株及下痢型腸炎弧菌株 ATCC-17802。抗原的部

分先是分析了下痢檢測基因 TLH 及 pVPA3-1 質體上之檢測標的 ToxA 序列後，以軟體進行抗原決定位 (epitope) 模擬預測，再委託生技公司以化學合成方式生產該蛋白質序列，取得合成蛋白質後，以此作為抗原。抗體亦是委託生技公司生產多株抗體，以兔子作為抗體生產者，每次間隔 21 天。最終取得 TLH 抗體濃度為 1.66 g/L，ToxA 抗體濃度為 1.59 g/L。為避免後續組裝試片時產生抗體之交叉反應，另外使用圓點墨點法加以分析，結果發現所生產之抗體間沒有交叉反應產生 (圖 1)。

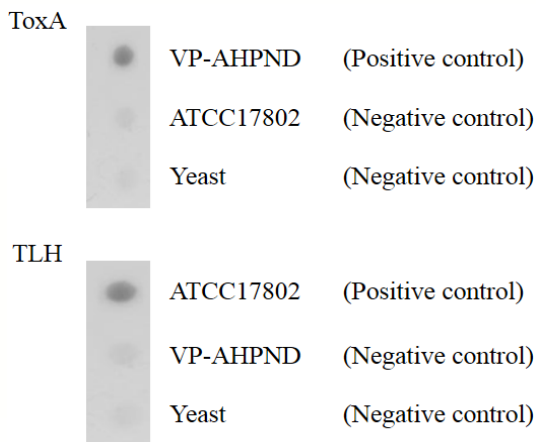


圖 1 ToxA 抗體及 TLH 抗體之圓點墨點分析法，結果顯示 2 種抗體無交叉反應並呈現高度專一性

二、快篩試紙之組裝

本次的多功能型快篩試紙是以開發競爭型快篩試紙為主，作法為在試片 T-Line 上固定抗原、C-Line 上固定 anti-Rabbit 抗體、膠體金結合墊 (conjugate pad) 上固定抗體—膠體金複合體，正常反應之競爭型快篩試紙上，陽性反應為 C-Line 呈色、T-Line 不呈色，陰性反應為 C-Line、T-Line 皆呈色 (圖 2)。

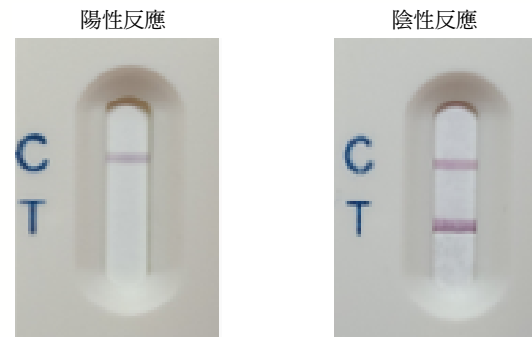


圖 2 競爭型快篩試紙判讀依據，陽性反應為 T-Line 不呈色，陰性反應為 T-Line 及 C-Line 皆呈色

三、水體濃縮

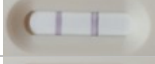
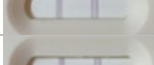
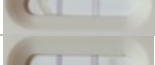
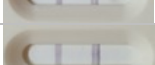
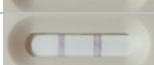
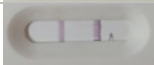
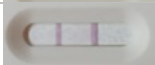
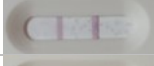
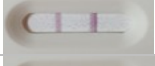
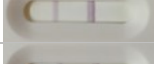
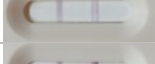
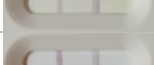
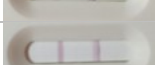
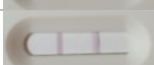
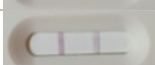
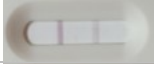
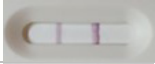
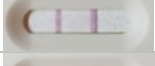
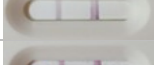
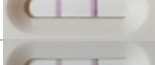
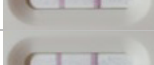
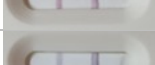
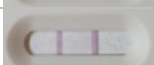
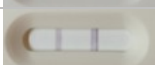
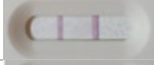
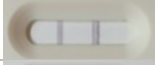
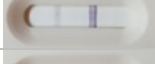
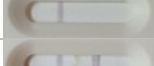
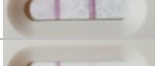
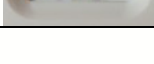
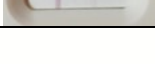
藉由 0.45 μm 過濾膜搭配可拆卸式過濾轉接頭，在水樣經過過濾膜後拆卸轉接頭並反轉過濾膜，以 3 ml 的菌體裂解溶液 (50 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.2% Triton X-100、10 mM β -mercaptoethanol、25 $\mu\text{g/ml}$ PMSF、40 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme) 再次通過過濾膜，將阻擋於膜上之微生物回沖至另一全新之 2 ml 微量離心管，即藉由減少水體的方式達成水樣中菌體濃縮之目的。

四、快篩試紙之專一性測試

利用快篩試紙進行專一性測試，以觀察對其他的細菌是否有偽陽性情形發生。將研究室的 48 種菌株分別調製為 10^8 CFU/ml 濃度後，於 1.5 ml 微量離心管滴入三滴檢體 (約 120 μl)，經充分混合後室溫下靜置 10 分鐘，再以滴管從 1.5 ml 微量離心管中吸取樣品，滴入快篩試紙之樣品收集區中，等待樣品吸附移動至測試區，10 分鐘後判讀結果。結果發現在檢測的 48 株實驗室菌株中，僅有標準菌株有陽性反應 (如表)，顯示其快篩試紙具有高度專一性。

ToxA 及 TLH 競爭型膠體金試片專一性測試，結果顯示僅 47 及 48 號 *V. parahaemolyticus* 菌株分別對 ToxA 及 TLH 競爭型快篩試紙呈陽性反應，其餘 46 株菌株皆呈陰性反應

序號	ToxA 檢測結果	TLH 檢測結果	菌 種 名 稱
1			<i>Aeromonas hydrophila</i>
2			<i>Edwardsiella tarda</i>
3			<i>Escherichia coli</i>
4			<i>Vibrio alginolyticus</i>
5			<i>Escherichia coli</i>
6			<i>Vibrio harveyi</i>
7			<i>Photobacterium damsela sub. damsela</i>
8			<i>Vibrio anguillarum</i>
9			<i>Vibrio vulnificus</i>
10			<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
12			<i>Enterococcus faecalis</i>
13			<i>Lactococcus garvieae</i>
14			<i>Aeromonas salmonicida</i>
15			<i>Enterococcus faecium</i>
16			<i>Escherichia coli</i>
17			<i>Streptococcus mutans</i>
18			<i>Staphylococcus epidermidis</i>
19			<i>Staphylococcus aureus</i>
20			<i>Staphylococcus aureus</i>
21			<i>Listeria monocytogenes</i>
22			<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>
23			<i>Photobacterium leiognathi</i>

24				<i>Vibrio furnissii</i>
25				<i>Vibrio fluvialis</i>
26				<i>Vibrio campbellii</i>
27				<i>Vibrio diazotrophicus</i>
28				<i>Vibrio aestuarianus</i>
29				<i>Vibrio marinus</i>
30				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
31				<i>Vibrio proteolyticus</i>
32				<i>Vibrio natriegens</i>
33				<i>Vibrio nereis</i>
34				<i>Vibrio mimicus</i>
35				<i>Lactococcus lactis</i>
36				<i>Lactococcus garvieae</i>
37				<i>Lactococcus raffinolactis</i>
38				<i>Photobacterium leiognathi</i>
39				<i>Vibrio nereis</i>
40				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
41				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
42				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
43				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
44				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
45				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
46				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
47				<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (帶有 pVPA3-1 質體菌株)
48				<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC17802 下痢致病株)

五、快篩試紙之靈敏度測試

將帶有 pVPA3-1 質體菌株及下痢標準菌株 ATCC-17802 的菌種濃度稀釋為 10^8 CFU/ml、 10^7 CFU/ml、 10^6 CFU/ml、 10^5 CFU/ml、 10^4 CFU/ml 及 10^3 CFU/ml 後進行試紙檢測，結果顯示 ToxA 快篩試紙的靈敏度可達 $10^3 - 10^4$ CFU/ml，TLH 快篩試紙則是 $10^5 - 10^6$ CFU/ml (圖 3)。

六、田間試驗

本次田間試驗的水樣採集自臺南及高雄地區的 42 個養蝦池，每一池取 50 ml 池水；另由高雄醫學大學分子生物實驗室使用快篩試紙進行 32 株下痢致病菌株之檢測。水樣透過濃縮套組進行 50 倍濃縮，隨後以上述快篩試紙測試，結果顯示 42 池中僅一池的水樣測得 ToxA 陽性反應，其餘為陰性。交由高醫大測試之 32 組分離菌株方面，有 8 組測得

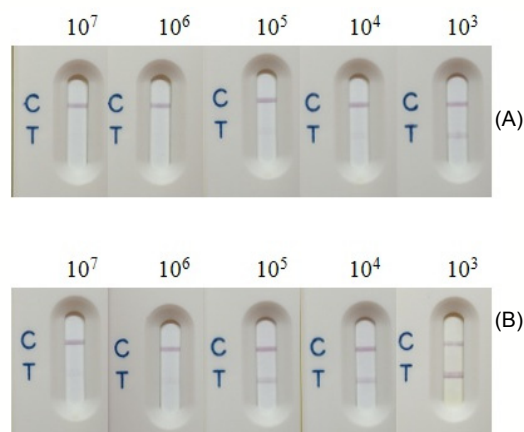


圖 3 ToxA 及 TLH 競爭型快篩試紙靈敏度試驗，結果顯示(A)：ToxA 偵測極限可達 $10^3 - 10^4$ CFU/ml；(B)：TLH 則是 $10^5 - 10^6$ CFU/ml

TLH 陽性反應，其餘為陰性 (圖 4)。將上述樣本進行即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)，結果發現與田間試驗一致 (圖 5)，顯示本快篩試紙之高專一性可取代實驗室精密儀器並可於田間現場進行疾病檢測。



圖 4 TLH 競爭型快篩試紙田間試驗，結果顯示 32 組分離菌株方面有 8 組 (編號第 1、5、11、12、18、26、27、28 號) 測得 TLH 陽性反應，其餘為陰性

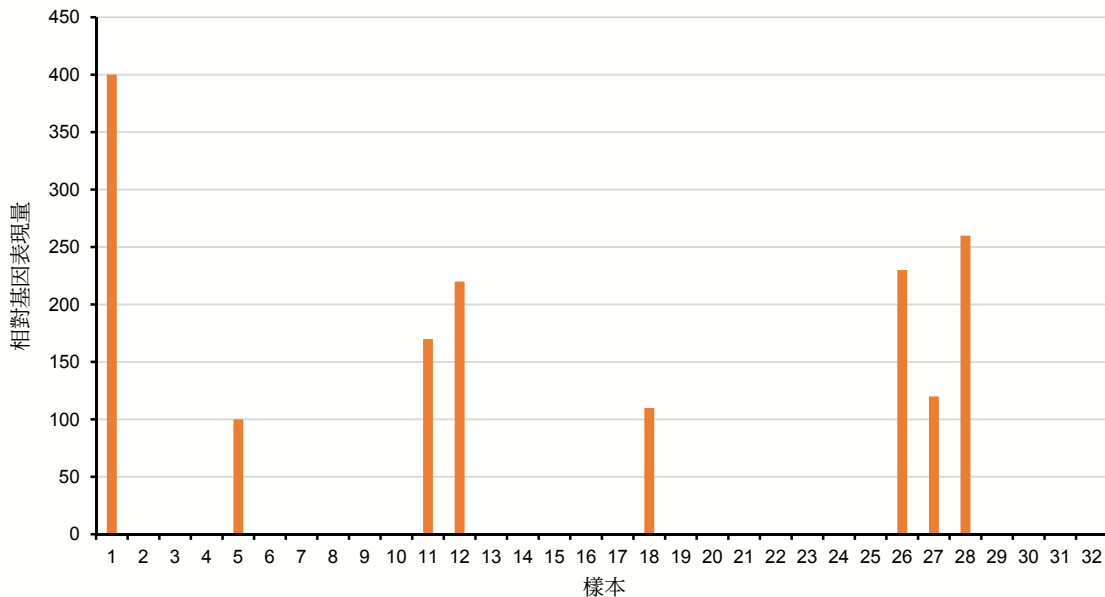


圖 5 TLH 即時聚合酶鏈鎖反應之相對定量，TLH 測試在第 1、5、11、12、18、26、27、28 號有明顯表現量，與田間試驗結果一致

結語

2018 年在瓜地馬拉舉行的水產養殖研討會中，泰國卜蜂食品之執行副總裁羅賓斯·麥金托什 (Robins McIntosh) 指出，2010—2015 年全球對蝦產量因為 AHPND 爆發，導致中國大量進口種蝦以彌補不足的產量；但自 2016 年起，因為抗病種蝦的選育及檢驗防疫落實，反而導致中國之蝦類產量過剩，引發供需失衡的現象，也因此影響全球蝦類市場。國內雖尚未傳出養殖蝦類大量暴斃的消息，但在這次田間試驗中，有一養殖池出現 pVPA3-1 質體的陽性檢出，後來回到現場，養殖業者已經將蝦池消毒清池，故無法取得蝦類檢體進一步確診。綜合考量到國際間養殖蝦類流通頻繁，且臺灣每年需自國外

進口相當數量的蝦類產品，國內養蝦業者仍應提高警覺。

目前國內常見的水產動物疾病實驗室檢測方式有聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)、巢式聚合酶鏈鎖反應 (Nested PCR)、即時定量聚合酶鏈鎖反應等，此類技術具有高度靈敏性，可針對特定基因擴增並判讀，但缺點是費時且須專業儀器支援。本所研發的快篩試紙，檢測之精準度高、操作時間短、檢測方法也相當簡便，就目前全球快篩試紙的靈敏度平均基準為 $10^3 - 10^4$ CFU/ml 來看，本快篩試紙已達到一定的水準，而 TLH 的靈敏度雖較低，但其專一性依然可以作為疾病診斷依據，因此藉由本快篩試紙之開發可防範於未然，快速應用於疾病的防治，達到減少用藥的功效。