

利用單株抗體來鑑定腸病毒分型

編輯部

非小兒麻痺性病毒的腸病毒 (nonpoliovirus enterovirus) 常常是引起嬰兒或小朋友急性發燒的主因，其他還包括有無菌性腦膜炎，呼吸道疾病，中耳炎及許多器官上的疾病，在診斷腸病毒最標準的方法是利用採集臨床上的檢體，例如：喉嚨拭子、鼻咽腔分泌物、直腸拭子或腦脊髓液來做病毒培養。腸病毒由臨床檢體中分離出的時間相當快，有 42 % 腸病毒可於三天內在培養中呈現，85 % 腸病毒可於七天內呈現。而腸病毒感染的早期診斷鑑定可影響到病人的處理方式，然而單憑腸病毒培養產生細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE) 的觀察是無法區別 poliovirus 或是 nonpoliovirus enterovirus 的各血清分型 (serotype)。腸病毒的鑑別分型相當重要，特別是在給予口服小兒麻痺疫苗年齡層的小朋友，在給予口服疫苗後的一到三週之內，可由喉嚨部位培養出病毒，而一到六週或更長時間則可出現在糞便培養中。因此，由這些部位培養出腸病毒，並不能代表為腸病毒即為致病菌，除非藉由血清分型來幫助診斷。

區別 poliovirus 與 nonpoliovirus enterovirus 的標準方法為中和試驗 (neutralization)，這個方法不僅麻煩、

昂貴且費時。因此，並不適用於一般臨床病毒實驗室中，其他可以用來區別腸病毒的方法，例如：聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 的方法 PCR 方法，主要是使用一組引子 (primers) 針對 poliovirus 的三種血清型加以區別，但此法不適合應用於臨床上，另外快速診斷腸病毒的方法如：核酸雜交法 (nucleic acid hybridization)，它比 PCR 方法更為廣泛使用，但仍無法完全區別這兩組病毒。

最近，間接免疫螢光分析法 (indirect immunofluorescence; IFA)，利用單株抗體來檢測分析腸病毒各類血清分型，已逐漸在市場中出現，在許多初步研究中顯示，利用 IFA 能夠鑑定超過半數經由培養分離出的腸病毒，這個簡單技術的使用，能夠有效的幫助臨床實驗室，快速的診斷區別 poliovirus 及 nonpoliovirus enterovirus。在本篇研究中，作者比較 IFA 及標準中和試驗在鑑定腸病毒分型上的差異。

在這個研究中，總共分析 291 株由臨床病人檢體中分離出的腸病毒，其中 196 株為 nonpoliovirus，95 株為 poliovirus。這些病毒於先前的細胞培養中，都有產生 CPE 的現象，皆存放在

— 70 °C 冰箱中，實驗時重新接種於 MRC-5 或 rhesus monkey kidney 細胞中 35 °C 培養，每日觀察 CPE 現象，當 CPE 達 50 % 時便將細胞刮下形成懸浮液，做成細胞抹片進行螢光染色。IFA 中使用的單株抗體購買自 Chemicon International 公司產品，其中包含三種單株抗體混合，分別為：poliovirus 單株抗體；含 serotype I, II, III, coxsackievirus 單株抗體；含 coxsackievirus type B 的 serotype B1 至 B6, echovirus 單株抗體；含 serotype 4, 6, 9, 11, 30 及 34，根據試劑說明書操作，進行染色步驟，並以螢光顯微鏡觀察判讀結果。

這個研究實驗中所分析的 291 株腸病毒，分別來自各類檢體，包括直腸及喉嚨拭子、CSF、鼻咽腔沖洗液、血液等等。其中 234 株為過去 5 年 (1991 ~ 1995) 內所分離出的腸病毒，另外 38 株 poliovirus 為 1985 至 1990 年間所分離得到，因為此單株抗體僅包含幾個特殊的 serotype 的混合，所以並無法將所有分離出的腸病毒完全呈現，因此對照中和試驗的結果，預測使用 IFA 方法，在 95 株的 poliovirus 中可鑑定出 95 株，在 34 株的 coxsackievirus 應可鑑定出 26 株，在 161 株 echovirus 中應可鑑定出 107 株。分析實際實驗的結果，比較其陽性、陰性、偽陽性、偽陰性，以及各類主要腸病毒群的敏感性，特異性及陽性，陰性預測值。觀察其數據發現，就其敏感性而言，echovirus 最佳可達 93.9 %，最低為 poliovirus 達 73.1 %，但就特異

性而言，poliovirus 最好，高達 100 %，而所有三個 group 的腸病毒的陽性及陰性預測值都很高由 88.6 % 到 100 %。

作者為了證明 IFA 方法對於腸病毒的血清分型 (serotype) 鑑定是有幫助的，單就分析 1991 年至 1995 年連續 5 年中由臨床實驗室中分離到的 234 株腸病毒，以 IFA 可鑑定出 173 株腸病毒，檢出率達 74 %，而其結果與中和試驗的一致性達 92 %。IFA 對於 poliovirus 鑑定具有相當高的特異性 (100 %)，但具較低的敏感性 (73.1 %)，其中作者更發現一株 echovirus type 11 能被 poliovirus 及 echovirus 的抗體同時染上，並將此結果剔除，如重新納入則是針對 poliovirus 唯一的偽陽性，特異性將降低 0.5 %。而 IFA 對於 echovirus 鑑定具有很高的敏感性 (93 %)，但較低的特異性 (90 %)，其主要原為此單株抗體混合液，並沒有包含所有的血清型，且此抗體會與其他的 nonpliovirus 有交叉反應，IFA 對於 coxsackieviruses type B 鑑定其敏感性為 85 % 而具有較高的特異性 (99.6 %)，對於偽陽性的結果，此單株抗體能與一株 coxsackieviruses type A21 發生交叉反應，及一株 poliovirus type 1 同時被 coxsackievirus 及 echovirus 的抗體同時染上，若納入此結果其特異性將降低 0.4 %。

綜合以上的結果，此研究利用市售的 IFA 試劑組，來鑑定 poliovirus 其陽性預測值近乎 100 %，換句話說如果將分離出的腸病毒以此 IFA 抗體鑑定為

poliovirus 陽性者，則此結果近似真值，而鑑定為 poliovirus 陰性時，則可信度達 89 %。若利用此 IFA 單株抗體，將能夠幫助腸病毒中 echovirus 及 coxsackieviruses B 的分型鑑定。但對於使用這三種單株抗體混合液染色，為陰性結果時，不能就此認定為非腸病毒，因為此抗體混合液並涵蓋所有的血清型。除了使用 IFA 方法進行快速診斷外，目前有相當多的研究學者使用 cDNA 探針，RNA 探針或 oligomeric 探針，直接作用於臨床檢體上，來進行腸病毒核酸雜交偵測，特別是對於體液檢體的分析。但是其敏感性只有 33 % 或更低。而現今最具發展潛力的方法是使用 PCR，它能夠偵測出絕大部份腸病毒的血清型，並且再顯性佳，能夠快速的診斷出腸病毒所造成的腦膜炎，以有效給予病人治療及照顧。但此法受限於技術及設備，無法在大多數臨床病毒室中操作。因此，就本次實驗結果中觀察，使用 IFA 單株混合抗體，可鑑定分型培養出的腸病毒達 74 %，且與傳統中和試驗的配合程度可達 92 %，不失

為一個不錯的方法，能夠於等待中和試驗結果前的一個有效的初步結果。

【譯者評】今年 5 月間所持續出現的腸病毒 71 型大流行，帶給一般臨床病毒室很大的衝擊，突然爆增檢體的湧入及大量等待鑑定分型的陽性培養，給臨床醫檢師們極大耐力和精力的考驗，因為一般腸病毒所使用的鑑定法，中和試驗不僅耗時，費事，且每個實驗室間存在一些不同的誤差，有時更出現無法辨識的結果，造成實驗室的困擾。雖然目前可應用 PCR 的方法協助腸病毒的分型，但並非所有的臨床病毒室均能辦到。在此篇研究文章中，所使用的單株抗體免疫螢光分析法，似乎可以提供臨床病毒室另一個新的鑑定方式，以達快速診斷的目標，儘快提供醫師對於病患的診斷，並適時的給予治療。
(陳寶珍摘評)

參考文獻

1. Rigonan AS, Mann L, Chonmaitree T: Use of monoclonal antibodies to identify serotypes of enterovirus isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1877-81.