

計畫編號：DOH91-DC-2003

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

腸病毒 71 型快速檢驗試劑(IgM Capture ELISA)  
之研發及評估

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：王聖予

研究人員：林翠莉、許淑華、陳豪勇

執行期間：九十一年一月一日至九十一年十二月三十一日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

# 目 錄

|          | 頁 碼  |
|----------|------|
| 封面       |      |
| 目錄       | (1)  |
| 壹、 摘要    | (2)  |
| 貳、 前言    | (3)  |
| 參、 材料與方法 | (4)  |
| 肆、 結果    | (5)  |
| 伍、 討論    | (6)  |
| 陸、 參考文獻  | (8)  |
| 柒、 圖一    | (10) |
| 表一       | (10) |
| 圖二       | (11) |

## 腸病毒 71 型快速檢驗試劑(IgM-capture ELISA)之研發及評估

### 摘要

經由民國 87 年至今的研究檢驗結果顯示，除了民國 88 年外，腸病毒 71 型為引發國內兒童感染腸病毒重症及死亡的最主要因子，每年皆造成數名至數十名兒童的死亡，由此可知其於防疫上的重要性。目前國內對於腸病毒之檢驗，仍以傳統的病毒分離為主，惟受限於病毒培養所需的時間，往往需要一至二周左右才能加以確認，影響後續防疫工作甚鉅，因此設計及改良現行之腸病毒檢驗方法並研發快速檢驗試劑，於疾病初期迅速加以確認，即時治療及推動各項防疫措施，是目前國內腸病毒防治刻不容緩的工作。

本計畫所研發之腸病毒IgM Capture ELISA，除具備敏感、快速之優點，更可做為新近感染之指標。而利用此方法檢驗腸病毒重症患者血清，可在 4 個小時內快速測定腸病毒 71 型的感染。於本項實驗中，利用本局 2000 年執行「腸病毒血清流行病學調查」計畫所採之 207 件健康族群陰性血清之平均值+4 標準偏差作為篩選值，待測檢體則為 2002 年臺灣地區疑似腸病毒重症個案所採得之急性期及恢復期血清共 258 件，每件檢體皆同時進行中和抗體試驗，並以該項結果併同個案之病毒分離結果做為本試劑之對照以進行綜合性評估，結果顯示抗腸病毒 71 型IgM抗體陽性率會隨著中和抗體的上升而增加，此外，病毒分離結果為腸病毒 71 型陽性者，其IgM抗體之陽性比率可達 100%。

關鍵詞: 中和試驗、棋盤滴定法、篩選值

## Abstract

According to the laboratory and research data from 1998 shows that except 1999, EV71 has been identified as the principal etiological agent of the annual enterovirus epidemics in Taiwan. At present, laboratory tests for EV71 consist mainly of virus isolation and neutralization test(NT). but the cumbersome procedure and time-consuming still a major problem. Therefore an attempt has been made to develop a sensitive and rapid diagnostic system for detection of IgM antibody in the early stage of the infection.

An IgM capture ELISA for the detection of EV71 antibody has been described, after 258 human sera of suspected enterovirus severe cases were tested by both neutralization test and virus isolation. And it was demonstrated that a good correlation between those tests. The higher the NT titer shows the increased percentage of EV71 IgM, and all the cases that EV71 isolation positive shows the IgM antibody in both of the acute and convalescence sera.

key words: NT 、checkerboard titration 、cut-off value

## 前言

臺灣地區在民國 87 年爆發腸病毒的大流行，流行高峰分別出現於五至六月及七至八月，在當時共奪去了 78 位兒童的寶貴生命，對整個社會造成極大的衝擊及傷害，而腸病毒 71 型則是該次流行的主要原兇<sup>(1)</sup>。根據這幾年來實驗室的監控資料顯示，雖然每年在臺灣流行的腸病毒種類有些不同，但因腸病毒 71 型會侵犯神經系統而引發嚴重的併發症，故仍是造成國內兒童腸病毒重症及死亡的最主要因

子。目前對於腸病毒的實驗室診斷仍以傳統的病毒分離<sup>(2)</sup>為主，也就是先將病毒在細胞中培養增殖後，再以特異性的單株抗體用間接螢光抗體染色法進行病毒的分型鑑定，由於所需時間較長，常影響後續防疫工作之推動，至於中和抗體試驗(Neutralization test, NT)<sup>(3)</sup>，由於過程繁複且耗時，加上技術人力的缺乏，使國內具此檢驗能力的實驗室屈指可數。雖然RT-PCR也常用於腸病毒 71 型的早期偵測，但根據這些年來腸病毒重症檢驗結果統計顯示，經由RT-PCR所確認之腸病毒 71 型個案比率相當的低。

酵素標幟免疫分析法是實驗室鑑定病毒感染常使用的一種方法<sup>(4)</sup>，由於其具有快速、敏感等優點，近年來已成為許多疾病的主要檢測方式，本實驗利用酵素標幟免疫分析法快速檢驗之特性，以抗人類 IgM 抗體捕捉患者血清中之 IgM 抗體，再利用病毒來結合，研發 IgM Capture ELISA 快速檢驗試劑，用以測定腸病毒重症之腸病毒 71 型 IgM 抗體，不但能大幅縮短腸病毒 71 型檢驗時間，更能做為判斷是否初次感染之指標。此項檢驗系統之建立，對於國內腸病毒 71 型病原體感染之鑑定與確認，應更具時效性及完整性，並可及時提供防疫決策上的參考。

## 材料與方法

### 血清檢體

收集 2002 年臺灣地區通報之疑似腸病毒重症患者血清檢體共 258 件(至 11 月 30 日止)，其中包括成對血清 139 件(含採血 3 次之 3 個個案)及單支血清 119 件，而為訂定本項檢驗之篩選值，另選取 2000 年執行「腸病毒血清流行病學調查」計畫所收集之健康族群血

清檢體共 207 件進行分析以決定篩選值 (cut-off value)。

### 腸病毒 71 型之培養及純化

本實驗採用之腸病毒 71 型病毒株係由民國 87 年員林鎮六歲男童體內所分離，經接種於 RD (人類橫紋肌肉瘤) 細胞中大量培養，收集細胞液於 4°C、2100g (3000rpm, Beckmen J-GB) 離心 15 分鐘，上清液移至耐氯仿 (chloroform) 之離心管，加入 1/10 量之 chloroform，振盪混合 15 分鐘，於 4°C、2100g 離心 15 分鐘後收集上清液，過濾後經 UV 照射去活化，再依 Reed and Muench 之方法測定病毒效價。

### 中和抗體測試<sup>(5、6、7、8)</sup>

所有血清檢體皆以中和抗體檢驗判定中和抗體效價，首先將血清樣本以 1:8 的比例稀釋 (血清 100  $\mu$ l 加 PBS 700  $\mu$ l)，加熱 56°C 30 分鐘後，再依 Schmidt N-J 等之方法<sup>(5)</sup> 系列稀釋後加入 71 型腸病毒培養，第 4 天判定血清中和抗體價，即對照細胞形態正常，而對照血清檢體對細胞發育無不良影響或者是有毒性，但其倍數不影響中和抗體價之判定者，則最高血清稀釋倍數之 50% 能完全阻止 CPE，即為該血清之中和抗體價。

### 病毒分離及鑑定<sup>(9、10、11、12)</sup>

所有疑似重症個案之檢體 (包括咽喉拭子、肛門拭子、糞便等) 皆另由本局委託之合約實驗室進行病毒培養，出現 CPE 者再以間接免疫螢光法 (IFA) 進行染色，以進一步鑑定出病毒型別。

## IgM capture ELISA

96 孔培養盤先吸附山羊抗人IgM抗體，4°C 靜置隔夜，以磷酸鹽緩衝溶液-Tween20 (PBST) 清洗四次後，加入 1% 牛血清白蛋白磷酸鹽緩衝溶液填塞，以PBST清洗四次，加入 50  $\mu$ l 稀釋 100 倍之待測血清、陽性及陰性對照血清，放置 37°C 培養箱 1 小時，清洗四次後加入 100  $\mu$ l 預先混合之腸病毒 71 型及鼠抗腸病毒 71 型單株抗体，放置 37°C 培養箱 1 小時，同樣方式清洗後加入 100  $\mu$ l 稀釋 4000 倍之山羊抗鼠IgG抗体-HRP結合體，37°C 作用 1 小時，清洗後加入 100  $\mu$ l 酵素受質體 TMB/E，室溫作用 30 分鐘後以 2N 硫酸終止反應，於 450nm 微量滴定盤分光儀測量吸光度(OD)。

## 結果

### 棋盤滴定法

檢體血清、腸病毒 71 型、腸病毒 71 型單株抗体及山羊抗鼠IgG 抗体-HRP結合體皆以棋盤滴定法決定最適當濃度，結果顯示個別稀釋濃度為 1:100、 $9.5 \times 10^{11}$ TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l ( $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 稀釋 3000 倍)、1:3000 及 1:4000 時，可得到最好的結果。

### 腸病毒 71 型陰性血清之測定

207 件經NT檢測為腸病毒 71 型陰性之健康族群血清，以IgM Capture ELISA測其OD<sub>450</sub>吸光度，結果分佈如圖一，以這些陰性血清之OD<sub>450</sub>平均值+4 標準偏差所得到的篩選值為 (0.301+4 $\times$ 0.07)，也就是當待測血清的OD<sub>450</sub>值大於 0.581 時，即判定為陽性。

### 疑似腸病毒重症患者血清之測定

所有血清檢體分別以NT及IgM Capture ELISA測定，結果如表一，顯示腸病毒 71 型IgM抗體陽性率隨中和抗體之上升而升高，當中和抗體效價達 1:256 以上時，IgM Capture ELISA之陽性率可達 100%。而對照病毒分離的結果，發現 38 名體內分離出腸病毒 71 型之重症患者，其急性期及恢復期血清共 61 件，IgM抗體血清皆呈現陽性反應，而 2 次採血間隔適當者共 12 個案，其恢復期之IgM較急性期有明顯上升之現象。

## 討論

本研究係研發腸病毒 71 型IgM快速檢驗法，並與現行之病毒分離及中和抗體試驗進行評估，實驗結果證明二者之間具有良好的相關性。由表二顯示之發病日和IgM抗體陽性之關係可看出，採血病日至 70 天左右仍可測得IgM，不過，仍以 7 日內的急性期為最高。根據Ogra PL等人的研究指出<sup>(13)</sup>，口服小兒麻痺（同為腸病毒之一種）疫苗約一周後，IgM會很快的出現在血液中，並可持續至 64 天左右才緩慢下降。

目前臺灣地區對於腸病毒的實驗室診斷，是以傳統的病毒分離做為例行性檢驗項目，至於某些無法分離出病毒或需進一步分型的檢體，則進一步送至本局以中和抗體檢測，而無論在病毒分離或血清學檢測上，都需要花費相當長的時間，特別是腸病毒的種類繁多，在型別的鑑定上更是繁瑣而耗時，又易受人為疏失及主觀判斷之影響，較不適用於大量樣品之檢驗。由於實驗室診斷結果對於後續防疫之推動及防治工作之進行相當重要，例如國內腸病毒紅燈預警區及停課措施的宣佈即主要以腸病毒 71 型重症是否出現為主要依據，因



此迫切需要設計及改良傳統的檢驗方法，研發快速檢驗試劑並建立腸病毒 71 型快速檢驗系統，除將檢測時間縮短外，同時可處理大量的檢體，有效節省人力物力，而 IgM 抗體的檢測，可於疾病初期即加以確認，不致延誤病患就診治療之首要時機，因腸病毒 71 型感染易引起併發症，且往往在一星期內即轉成重症，故若能提早確知所感染之病毒類型，即可掌握早期對症治療，以降低兒童的死亡率，而相關結果更可為後續防疫推動及防治工作進行之參考，避免疫情之蔓延及擴大，對於台灣地區腸病毒 71 型病原體感染之鑑定與確認，應更具時效性。

酵素標幟免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是實驗室鑑定病毒感染常使用的一種方法<sup>(14)</sup>，由於其具有反應靈敏、快速、機器判讀減少主觀誤差以及可同時處理大量檢體等優點，目前已發展出相當多種類的快速試劑供實驗室使用。ELISA 另外一個優點是可以檢測相當低濃度的抗體存在，甚至在其他血清學方法無法確認時，即可偵測出抗體的存在，這可由本實驗中病毒分離陽性而中和試驗仍為陰性的檢體得到證實。

由非專一性結合所導致的偽陽性反應是 ELISA 檢驗系統常困擾的一個問題，病毒的純化、除了可降低非專一性結合外，也可增加實驗的專一性<sup>(15、16)</sup>。而在清洗及稀釋緩衝液中加入適量的 Tween、牛血清白蛋白等，以及將 OD<sub>450</sub> 吸光度減去對照讀值，皆可有效降低偽陽性反應。

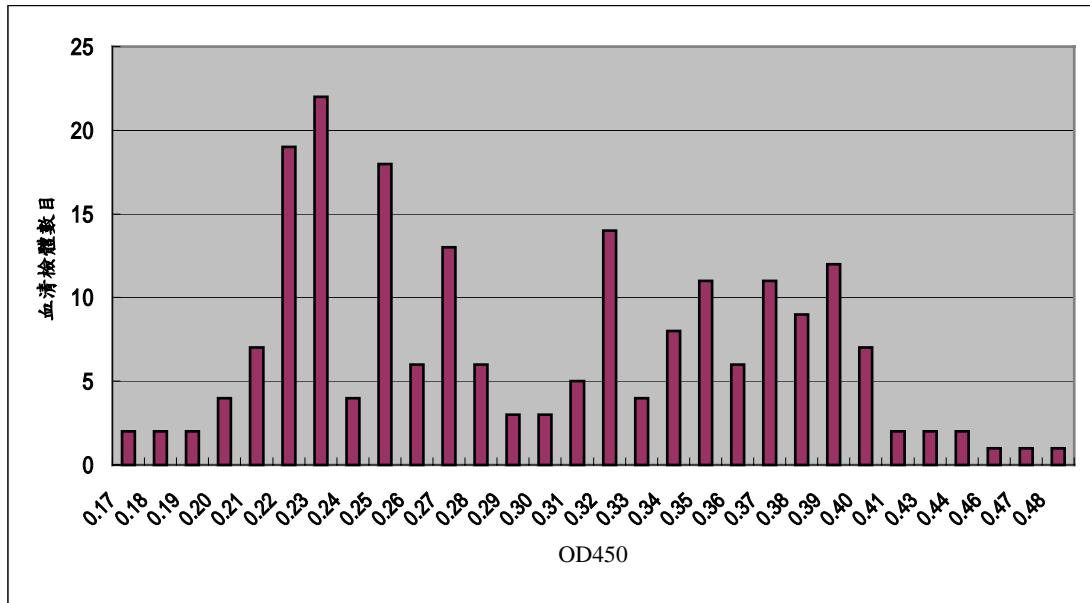
由於腸病毒 71 型在臺灣地區的某些縣市已有逐漸成為地方性 (endemic) 疾病的趨勢，幾乎每年都會發生，而且造成許多兒童的死亡，IgM 抗體之檢測，可於疾病初期即迅速加以確認，除協助提供早期診斷治療以降低兒童的死亡率外，更可為後續防疫推動及防治工

作進行的參考，避免疫情之蔓延及擴大。此外，本項系統所建立之相關實驗模式並可提供應用至其他種類之腸病毒，提升國內腸病毒檢驗水準及防疫效率。

#### 參考文獻

1. Ho M, Chen E-R , Hsu K-H, et al: An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *New Engl J Med* 1999;341:929-35.
2. Shaw E-D, Newton A, Powell A-W, et al: Fluorescent antigen-antibody reaction in Coxsackie and ECHO enteroviruses, *Virology* 1961;15:208-210.
3. Melnick J-L, Wenner H-A, Philips C-A: Enteroviruses. In G-H Lennette, N-J Schmidt. Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, Ed. 8, *Am Pub Heal Assoc* 1979;471-534.
4. Bidwell D-E, Buck A-A: The enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull WHO* 1976; 54:129-39.
5. Schmidt N-J and Lennette E-H: Advances in the serodiagnosis of viral infections. *Prog Med Virology* 1973;15 : 244 - 308.
6. Hsiung G-D. DIAGNOSTIC VIROLOGY; An Illustrated Handbook. *Revised and Enlarged Edition*.1973.
7. Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, et al: Enterovirus 71 from Fatal and Nonfatal Cases of Hand, Foot and Mouth Diseases Epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997 - 1998. *Jpn J Infect Dis* 1999;52:12-5.
8. Nobuyuki Kobayashi and Kyosuke Nagata: *Protocols of Virology First Edition*. 1995.
9. Prather S-L, Dagan R, Jenista J-A and Menegus M-A: The isolation of enteroviruses from blood : a comparison of four Processing methods.

- J Med Virol* 1984;14 : 221 – 7.
10. Robert H-A, Romero J-R: Laboratory diagnosis of enteroviral infections p.401 – 18. In H.A. Robert (ed.), Human enterovirus infections. *Am Soc Microbiol*, Washington, D.C.
  11. Chonmitree T, Ford C, Sanders C and Lucia H-L: Comparison of cell cultures of rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol* 1988;26:2576 – 80.
  12. Bastis, D Simonet S, Patterson MA and Neill S: Identification of enteroviruses by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies. *Sem Diagn Virol* 1995;3 : 83 – 93.
  13. Ogra PL, et al : Viral vaccination via the mucosal routes. *Rev. Infect. Dis.* 1980; 2:352-369.
  14. Ohkubo Y, Takashima I, Hashimoto N, Fujita I: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of IgM and IgG antibodies to Japanese encephalitis virus in sera from experimentally infected swine. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46: 57-64.
  15. Frazier CL, Shope RE: Detection of antibodies to alphaviruses by Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 583-5.
  16. Chow L, Tseng TC. Detection of serum antibody to herpes simplex virus type I by Enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin J Microbiol Immunol* 1981; 14:46-53.



圖一 · IgM capture ELISA 測定健康族群陰性血清之OD<sub>450</sub> 分佈狀況

| NT      | ELISA |       |    |        | Tot |
|---------|-------|-------|----|--------|-----|
|         | -     | %     | +  | %      |     |
| 1:<8    | 53    | 94.6% | 3  | 5.4%   | 56  |
| 1:8     | 18    | 90.0% | 2  | 10.0%  | 20  |
| 1:16    | 15    | 71.4% | 6  | 28.6%  | 21  |
| 1:32    | 6     | 60.0% | 4  | 40.0%  | 10  |
| 1:64    | 4     | 50.0% | 4  | 50.0%  | 8   |
| 1:128   | 3     | 13.0% | 20 | 87.0%  | 23  |
| 1:256   | 5     | 11.9% | 37 | 88.1%  | 42  |
| 1:512   | 0     | 0.0%  | 36 | 100.0% | 36  |
| 1:1024  | 0     | 0.0%  | 23 | 100.0% | 23  |
| 1: 1024 | 0     | 0.0%  | 20 | 100.0% | 20  |

表一、腸病毒疑似重症血清之NT及IgM capture ELISA

| 採血病日  | EV71-IgM 陽性數 | 陽性率    |
|-------|--------------|--------|
| 1-7   | 99           | 63.87% |
| 8-14  | 7            | 4.52%  |
| 15-21 | 18           | 11.61% |
| 22-28 | 14           | 9.03%  |
| 29-35 | 4            | 2.58%  |
| 36-42 | 3            | 1.94%  |
| 43-49 | 3            | 1.94%  |
| 50-56 | 1            | 0.65%  |
| 57-63 | 1            | 0.65%  |
| 64-70 | 1            | 0.65%  |
| > 70  | 1            | 0.65%  |
| 不明    | 3            | 1.94%  |
| 合計    | 155          | 1.94%  |

表二、腸病毒疑似重症血清採血病日及IgM陽性率