

計畫編號：DOH92-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

建立萊姆病快速檢測系統

研 究 報 告

執行機構：衛生署疾病管制局

計畫主持人：黃瑞禎

研究人員：陳菁瓊、邱詩惠、呂亞蓉

執行期間：92年1月1日至92年12月31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

目錄	頁次
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	9
結果與討論	11
結論與建議	13
參考文獻	15
圖表	
圖一、市售全菌抗原與自製全菌抗原之抗原差異性比	17

摘要

關鍵詞：萊姆病、伯氏疏螺旋體、抗體快速檢測

萊姆病為蜱媒介傳播之新興人畜共通的傳染病，其流行於北半球溫帶氣候區。藉由帶有伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) 的蜱叮咬，使人獸感染。蜱蟲以鼠類、鹿等哺乳動物與鳥類為主要宿主，犬、馬與人類因暴露於帶有蜱蟲宿主的活動區域，與蜱蟲接觸而遭叮咬致病。疾病管制局係自八十九年起開始進行該項疾病之檢驗及監測，截至九十二年底止，通報病例共計 699 件，其中確定病例計有 96 例。本計畫採用伯氏疏螺旋體 B31 菌株做抗原，利用免疫層析原理發展 one-step 快速診斷萊姆病抗體之檢驗試劑，希望加速第一線快速檢測，進而監控萊姆病之發生，提供醫師最快速之治療建議。惟萊姆病陽性標準血清數量過少，使開發出的萊姆病快速檢測試劑，致雛形測試結果之代表性略嫌不足。檢驗試劑的特異性及敏感度與預期有落差，而未達預期效益。未來將開發出的檢測試劑，送往國外萊姆病參考實驗室，以完成雛形試劑的

測試。

Abstract

Keywords: Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, rapid antibody screening

Lyme disease, which is prevalence in the temperate zoon in the Northern Hemisphere, is a tick-borne zoonosis. Ticks, which carry the pathogen, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, could infect people and animals by means of biting. The main hosts of ticks are mammals (eg. rats, deers) and birds. Canine, equine and people that expose to the environment where the ticks' hosts live might be bitten by the ticks and get sick. The CDC has started examining and monitoring this disease since 2000. Until the end of 2003, there are 699 reported cases, including 96 confirmed ones. In this project, we use *Borrelia burgdorferi sensu lato* strain B31 as antigens to develop one-step rapid diagnostic kit for detection of anti-Lyme disease antibodies. Hopefully, the kit would be a first line and correct examination method. And then, according to the results, we could provide doctors with suggestions for treatments as fast as possible. Because the limited amounts of standard positive sera are available, it is hard to make the preliminary results to be more representatively. The sensitivity and specificity of the kit could not fulfill what we expected. Neither could the benefits. In order to complete the kit development, we will

send the kits to the qualified Lyme disease reference laboratory for validation.

前言

萊姆病為蜱媒介傳播之人畜共通的傳染病，其流行於北半球溫帶氣候區。藉由帶有伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) 的蜱叮咬，使人獸感染。蜱蟲以鼠類、鹿等哺乳動物與鳥類為主要宿主，犬、馬與人類因暴露於帶有蜱蟲宿主的活動區域，與蜱蟲接觸而遭蜱蟲叮咬致病。依據感染的病程長短以及臨床症狀，共可分為三個時期。從感染初期出現皮膚症狀，擴散到內臟器官，影響到關節系統、心血管系統以及神經系統，引發多重系統的病變。

疾病管制局係自八十六年起開始進行該項疾病之檢驗及監測，截至九十年底止，通報病例共計 699 件 (89 年計有 171 例，90 年計有 528 例)，其中確定病例計有 96 例 (89 年計有 12 例，90 年計有 84 例)。調查臺灣八大縣市的犬萊姆病病原血清抗體陽性率，結果某些縣市陽性率居然高達百分之二十以上，即每五隻狗即有一隻狗感染過萊姆病，因此此項傳染病不容忽視。然而預防的方式主要應對壁蝨的主要宿主：狗來做監控對象。需要檢驗狗是否感染

萊姆病及對狗施打預防針，此外對於蜱的防治也是相當重要。

萊姆病的實驗室診斷，最佳的標準還是從病變區，培養鑑定出病原體。但是僅在感染初期時培養成功率較高，但是在病程進入第二期後，敏感度劇降；因此大部分依據血清學檢測結果作為實驗室判定方法。美國疾病管制局現行的血清學判定標準，建議採用兩階段檢測，以降低檢驗的偽陽性，提高檢驗特異性。第一階段使用酵素免疫分析法或間接螢光免疫法檢測，陽性及無法判定為陰性的檢體，再經過西方墨點法來作第二次的檢測。西方墨點法的判讀標準為：IgG 抗體陽性必須在 18、21、28、30、39、41、45、58、66、93kDa 特異條帶中，至少有五個條帶以上出現反應。IgM 抗體陽性則是在 23、39、41kDa 三條帶中，至少出現兩個以上的條帶。

本計劃將利用免疫層析原理發展一種快速診斷犬萊姆病病原之檢驗試劑，希望加速第一線快速檢測，來了解萊姆病病原在動物分布及診斷，進而監控萊姆病病原之發生及最快速之治療。

材料與方法

菌株來源與菌體蛋白之製備：使用於本計畫之伯氏疏螺旋體菌株為 *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 菌株。

菌株使用 BSK 培養五天，以高壓細胞破碎儀製備全菌抗原。另購買 USBio *B. burgdorferi* B31 菌株之全菌抗原。

菌體外膜蛋白 OspC 重組蛋白製備。

試劑雛形開發與試劑組件測試

膠體金 - 抗體結合體製備與測試：選擇適當之膠體金與 mouse anti-human IgM 之抗體濃度進行結合反應，以取得系統最佳之指示劑。我們選用膠體金作為目標膠體進行結合，發現以 40 μ l/ml 有最佳之有效結合反應。

噴墨濃度測試：由製備出之病原體純化抗原與市售病原體純化抗原進行測試，以不同濃度的抗原固定在硝化纖維膜上，以擇出適當噴膜原料濃度等條件。

雛形系統特性分析

血清樣品的來源與確認：血清樣品由疾病管制局提供 24 個血清樣本。依據美國 CDC 公佈的血清兩階段檢測標準判定之，其中 19 個血清樣品為萊姆病陰性血清，5 個為

萊姆病陽性血清。血清分別經 Dako 與 C6 兩種 ELISA 試劑及西方墨點法檢測試劑檢測，並確認其檢測結果。

血清樣品與抗原特異性反應測試：將自製抗原或市售抗原吸附於 96 孔盤，利用 ELISA 法測試血清樣品反應狀況。

血清樣品之背景測試：以 PBS 或 Citric buffer 稀釋血清樣品，測試樣品對反應試藥條品管線的干擾情形。

陽性血清樣品比較測試：使用自製抗原與市售抗原，以不同抗原濃度行噴膜濃度測試，作為選擇適當之噴膜原料與血清反應條件之依據。

結果與討論

膠體金 - 抗體結合體測試結果: 10 μ l/ml 與 40 μ l/ml 的抗體與膠體金進行結合反應, 兩種抗體濃度製造之結合抗體皆有呈色反應, 惟低濃度組呈現紫色, 屬不穩定狀態, 故將採用高濃度 (40 μ l/ml) 作為膠體金與抗體結合條件。

雛形系統特性分析-陰性血清樣品之背景測試: 檢體會對試劑之反應有顯著影響, 由呈色可以得知, 由實驗結果選擇將檢體進行三倍稀釋後, 進行測試為佳。

確認抗原抗體特異性: #10、#22 陽性檢體在 ELISA 測試中呈現陽性反應 titer 較高, 而 #376、#429、#470、#517 陰性檢體則呈現陰性反應。

不同抗原來源噴膜濃度之測試線與陽性血清樣品之比較測試: 試藥條品管線噴上 0.9 mg/ml anti mouse IgM, 測試線噴上 0.1mg/ml USBio Ag、0.5mg/ml USBio Ag 及原倍自製全菌抗原。利用陰性血清與陽性血清進行測試, 其結果於品管線皆有呈色反應, 但測試線卻無呈色反應。

於本計劃此階段執行過程中所得之結果:

Gold-Ab conjugate 條件選擇 40ul Ab/ml gold。

NC membrane 對 C or T line 反應，無顯著之影響。擇一即可。

血清檢體的 background 很高，因而需要高濃度之 Gold-Ab。

由 ELISA 結果得知 #22 檢體與二種抗原 (B31, CDC prepare) 會有免疫反應發生，而 #399 陽性檢體則呈現陰性反應。抗原需再進行改良或增加來源篩選。

由 ELISA 得知二種抗原 (B31 strain，自製全菌抗原) 之特性是相同的。

以 ELISA 確認陽性血清檢體之 titer，其中以 #10、#22 為 titer 較高之血清。未來使用此三個檢體作為 one-step 模式之篩選測試樣品。

初步選擇之操作方式：

1. 先將檢體進行 20 倍稀釋。
2. 再將稀釋之檢體加入測試孔中。
3. 將測試片製入測試孔中反應 5 分鐘。
4. 於測試孔加入 gold-Ab，使測試片繼續反應 10-30 分

鐘。

5. 判讀結果。

結論與建議

於本計畫執行的期程中，初步建立了萊姆病快速篩檢檢測試劑的測試雛形。由於試劑開發時，並未如預期取得足夠的萊姆病陽性血清檢體，最後選出五個力價較高的陽性血清，進行雛形試驗。因此，在數量非常少的檢測試驗檢驗下，更增加分析與評估檢測試劑敏感度與特異性的困難，致開發出的檢測試劑，測試結果並未達到我們預期的成效，未來也有許多改進的空間。在執行計畫的期間，我們提出以下的想法與建議：

過去認為是萊姆病陽性血清，複驗結果發現，其抗體專一性與敏感性大多不足以用來發展檢測試劑，使得只選出5個樣品，進行雛形試驗。使得測試的血清代表性略嫌不足，造成檢驗試劑結果難以評估優劣。未來繼續進行萊姆病檢驗時，將陽性檢體送往國際參考實驗室進行，另一方面也可以協助解決陽性血清不足，無法完成檢驗試劑的測試工作，可能的話將測試雛形送往國際參考實驗室，以協助測試。

參考文獻

Stevenson B: *Borrelia burgdorferi* erp (ospE-related) gene sequences remain stable during mammalian infection. *Infect Immun* 2002;70:5307-11.

Lawrenz MB, Kawabata H, Purser JE, Norris SJ: Decreased electroporation efficiency in *Borrelia burgdorferi* containing linear plasmids lp25 and lp56: impact on transformation of infectious *B. burgdorferi*. *Infect Immun* 2002;70:4798-804.

Heikkila T, Seppala I, Saxen H, Panelius J, Peltomaa M, Huppertz HI, Lahdenne P: Cloning of the gene encoding the decorin-binding protein B (DbpB) in *Borrelia burgdorferi* sensu lato and characterisation of the antibody responses to DbpB in Lyme borreliosis. *J Med Microbiol* 2002;51:641-8.

Mbow ML, Gilmore RD Jr, Stevenson B, Golde WT, Piesman J, Johnson BJ: *Borrelia burgdorferi*-specific monoclonal antibodies derived from mice primed with Lyme disease spirochete-infected *Ixodes scapularis* ticks. *Hybrid Hybridomics* 2002;21:179-82.

Chung YC, Tsai HY, Shih CM, Chao LL, Lin RY: Lyme disease in childhood: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan* 2002;43:162-5.

Stobel K, Schonberg A, Staak C: A new non-species dependent ELISA for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s. l. in zoo animals. Int J Med Microbiol 2002;291 Suppl 33:88-99.

Marques AR, Martin DS, Philipp MT: Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. J Clin Microbiol 2002;40:2591-3.

表一、市售全菌抗原與自製全菌抗原之抗原差異性比較

