

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

鈎端螺旋體快速檢測試劑之開發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2622-B-002-006-CC3

執行期間：92年06月01日至93年05月31日

執行單位：國立臺灣大學獸醫學系暨研究所

計畫主持人：潘銘正

計畫參與人員：林卉宜 林念農

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 93 年 8 月 31 日

鈎端螺旋體快速檢測試劑之開發

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2622-B-002-006-CC3

執行期間：2003 年 06 月 01 日至 2004 年 05 月 31 日

計畫主持人：潘銘正

共同主持人：

計畫參與人員：林卉宜、林念農

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、

列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立台灣大學獸醫學系

中 華 民 國 93 年 8 月 31 日

中文摘要

鉤端螺旋體感染症是溫熱帶地區常見的人畜共通傳染病，是由鉤端螺旋體感染所造成的，由於其臨床症狀表現不一，無法藉由單獨臨床表徵作為診斷，往往必須以實驗室的檢查加以輔助確認，目前採用的標準檢驗方法是顯微凝集試驗 (microscopic agglutination test, 簡稱 MAT)，這也是目前國際認可檢驗鉤端螺旋體的”黃金標準”，但操作上是以前各種血清型的活菌作為抗原，除了耗時外，對實驗室操作人員而言，具有高度危險性，故很多可以快速診斷且具屬特異性 (genus-specific) 的測試被發展出來。本實驗利用浸液試片檢驗方法 (dipstick test)，使用鉤端螺旋體重組蛋白質 LipL32 為抗原，評估此法是否適用於鉤端螺旋體感染症之血清學診斷，結果其敏感性為 14.9%，特異性為 81%，造成敏感性甚低的原因除了抗原量的多寡外，另外有可能是 LipL32 重組蛋白質抗原對 IgG 抗體的敏感性較佳，故未來可考慮增加 LipL32 重組蛋白質抗原量及以 IgG 抗體為主要偵測目的來進行改良。

關鍵詞：鉤端螺旋體感染症、浸液試片檢驗、LipL32 重組蛋白質

英文摘要

Leptospirosis is a widespread zoonotic disease that affects all mammals in different parts of the world. Clinical recognition of leptospirosis is challenging, and the definitive serologic diagnosis assay, the microscopic agglutination test (MAT) is the reference test for diagnosis, however, it is time-consuming and requires the maintenances of several leptospiral strains to be used as antigens, live organisms creating a risk of laboratory-acquired infections. We proposed a rapid dipstick test reagent for the detection of *Leptospira*-specific antibodies in human serum samples. The efficacy of the test was compared with MAT, which is regarded as gold standard. A total of 192 human serum samples were analyzed by both dipstick and MAT, the sensitivity for detection of leptospiral antibodies was 14.9%; specificity was 81%. The agreement (κ) with MAT was as low as 0.04. The results indicated that the recombinant LipL32 protein expressed in *Escherichia coli* BL21 is not suitable for detection of IgM antibodies

Keywords : leptospirosis, dipstick test, recombinant LipL32

前言

鈎端螺旋體感染症是一種世界性分佈的人畜共通傳染疾病，此病無法單獨以臨床症狀作為診斷，必須以實驗室檢查加以輔助確認，目前採用的標準檢驗方法是顯微凝集試驗 (microscopic agglutination test, 簡稱 MAT)，這也是目前國際認可檢驗鈎端螺旋體的”黃金標準”(Levett, 2001)，其操作特點是以各種血清型的活菌作為抗原，除了耗時外，對實驗室操作人員而言，具有高度危險性的。因此很多可以快速診斷且具屬特異性 (genus-specific) 的測試被發展出來，但這些測試方法所使用的抗原大多是以不活化的鈎端螺旋體全菌，但本菌為人畜共通傳染病，操作活菌具有危險性，故提供無病原性的重組蛋白質抗原作為鈎端螺旋體感染症的抗體診斷有其必要性(Flannery et al., 2001)。本實驗利用浸液試片檢驗方法 (dipstick test)，使用鈎端螺旋體重組蛋白質 LipL32 為抗原，評估此法是否適用於鈎端螺旋體感染症之血清學診斷。

研究目的

鈎端螺旋體是一種細螺旋形，兩端呈鈎狀的一種細菌。本菌能引起人及動物的一種人畜共同傳染病即鈎端螺旋體病。本病能感染的宿主範圍相當廣泛，包括許多家畜如牛、馬、羊、豬、犬等等以及野生動物。

目前鈎端螺旋體檢驗方法有細菌培養鑑定法及血清抗體檢驗法。然上述方法均需於具標準儀器配備之實驗室方可執行，並且均具有檢驗時間較長之缺點。因此，為達到早期診斷之效果，實有必要發展一種快速檢驗試劑，應用於第一線檢驗單位做初步篩選後，再將可疑樣品並至實驗室做確認。

簡易免疫層析試片，此項結合色層分析及免疫檢驗之單一步驟檢測法，操作更為簡單，不需清洗及儀器判讀，於 5 分鐘內即可測知結果，非常適合大量快速篩檢，並可推廣至一般基層檢驗單位作現場檢測，因此具疾病早期監控之效。

本計畫將利用免疫層析原理發展一種快速診斷鈎端螺旋體病原之檢驗試劑，希望加速第一線快速檢測，進一步了解鈎端螺旋體病原之分布及診斷，進而監控鈎端螺旋體症之發生之最快速之治療。

本計畫依三個階段進行研究與開發，(一)原料製備：收集或製備兩株以上之市售單多株抗體，病原菌純化抗原及重組蛋白，(二)建立快速免疫診斷試劑雛形試驗，(三)雛形套組特性分析 (敏感度、特異性及小量檢體之正確性試驗)。

文獻探討

浸液試片檢驗 (dipstick test) 是利用單株抗體的專一性，將抗原固定多孔性膜片上，膜片下方以吸水性材質來控制液體的流速，當檢體通過膜片時抗體會被膜片上的抗原捕捉，然後滴入的酶標示二抗會形成”抗原-抗體-酶標示二抗”複合體，其原理與 ELISA 類似但能縮短操作時間及簡化操作步驟，目前商品化的試劑主要是偵測血清中的 IgM 抗體(Hatta et al., 2000; Sehgal et al., 1999)。Smits 等收集了全世界五大洲十二個國家共兩千多個檢體來評定其效用並與 IgM- ELISA 做比較，發現其敏感性及特異性可分別達 60.1%、94.1%，與 IgM- ELISA 有很好的一致性，因此認為此方法可適用於國際間(Smits et al., 2000a)。另一側流免疫層析法 (lateral flow immunoassay) 是利用同一膜片上不同區域含有不同結合位的單株抗體來進行反應，目前市面上商品化的產品為荷蘭皇家熱帶研究所 (Royal Tropical Institute) 所研發的 Lateral Flow assay 商品化套組，利用無病原性的 *Leptospira biflexa* (strain

Patoc I)為抗原來進行試驗(Sehgal et al., 2003; Smits et al., 2001b)。

材料與方法

血清

選取自民國 91 年 11 月至 93 年 1 月共 192 個送檢之疑似鈎端螺旋體感染病患的血清，樣本數為 192 個，以顯微凝集試驗 (MAT)檢測血清抗體並以此做血清的分類，分類標準依照疾病管制局的建議 (衛生署疾病管制局, 2002)，血清相關資料如表 1。

表 1：血清分類與數量

血清分類	血清數量
確定病例 (MAT 有 4 倍力價變化)	27
血清陽性病例 (MAT \geq 100X)	60
血清陰性病例 (MAT 為陰性)	105
總數	192

浸液試片檢測

採用永昕生技公司所研發的鈎端螺旋體快速層析檢測試劑離型，此試驗是利用單株抗體的專一性，將抗原固定在多孔性膜片上，膜片下方以吸水性材質來控制液體的流速，當檢體通過膜片時抗體會被膜片上的抗原補捉，然後滴入的酶標示二抗會形成”抗原-抗體-酶標示二抗”複合體，使用的抗原為鈎端螺旋體重組蛋白質 LipL32(Haake et al., 2000; Yang et al., 2002)，其原理與 ELISA 類似但能縮短操作時間及簡化操作步驟，主要是偵測血清中的 IgM 抗體。

產品組件

1. 測試微孔盤：96 wells*2 packs / kit
2. 指示劑溶液：4.5 ml / bt, 1bt / kit
3. 稀釋液 (20 mM PB buffer pH 7.0)：15 ml / bt, 1bt / kit
4. 測試條：8 strips / pack, 13 packs / kit
5. 滴管：1 pack / kit

操作步驟

1. 將套組自冷藏環境取出回溫約 30 分鐘。
2. 依樣品需要，取出適量於微孔盤 (每個檢體最多使用 2 個 microwell)。
3. 使用 dropper 取 1 滴檢體加入 microwell 中，在加入 3 滴稀釋液，混合均勻。
4. 將指示劑溶液搖晃混合均勻，取 1 滴指示劑至另一個 microwell 中。
5. 取稀釋後的檢體 (步驟 3)加入步驟 4 之 microwell 中，搖晃 30 秒使混合均勻，靜置 3 分鐘。
6. 將測試條垂直置入微孔盤中，等待 20-30 分鐘。

7. 判讀結果

判讀方式

陽性：出現兩條紅線（圖 1）

陰性：出現一條紅線

無效：無紅色線出現

統計分析

以 MAT 結果做為 Gold standard 評估 Dipstick test 的敏感性、特異性。而試驗結果與 Gold standard 之間的一致性，則以 kappa value (κ)來做比較。

結果

此次實驗 Dipstick test 在 27 個確定感染病患血清中的陽性率為 29.6%，在 60 個血清陽性病患血清的陽性率為 8.3%，而在 105 個血清陰性病患的陽性率為 19%，如表 2 所示。以 MAT 為“gold standard”評估 Dipstick test 的敏感性、特異性及 kappa value，其中敏感性為 14.9%，特異性為 81%，kappa value 為 0.04，如表 3 所示。

表 2：Dipstick test 在鉤端螺旋體感染症之確定病例、血清陽性病例及疑似病例中的陽性率。

病例分類 / 試驗	試驗陽性血清數/各分類病例數(%)	
	Dipstick test	
確定病例	8/27	(29.6)
血清陽性病例	5/60	(8.3)
血清陰性病例	20/105	(19.0)

表 3：以 MAT 為 gold standard 評估 Dipstick test 在鉤端螺旋體感染疑似病例中的敏感性 (Se)、特異性(Sp)及 kappa value (κ)。

試驗種類	% (95% CI)		κ
	敏感性 (Se)	特異性 (Sp)	
Dipstick test	14.9 (11.2-19.5)	81.0 (76.4-85.6)	0.04

討論

鉤端螺旋體感染症以臨床症狀作為診斷的誤判機率很高，必須以實驗室的檢驗結果加以輔助。病原可以從檢體中直接以顯微鏡觀察或培養分離，但敏感性很低且困難度較高，也較費時。由於在出現臨床症狀後的 5-7 天，即可由血液中偵測到鉤端螺旋體的抗體(Adler and Faine, 2002)，大部分感染鉤端螺旋體的患者主要是仰賴血清學的檢查來診斷的。其中顯微凝集試驗比其他目前可用的試驗更具血清型診斷的特異性及敏感性，同時也是目前國際認可檢驗鉤端螺旋體的“黃金標準”(Levett, 2001)，但此方法需保有各種血清型的活菌作為抗原，因此具有危險性。目前以浸液試片檢驗原理製作的商品化試劑主要是偵測血清中的 IgM 抗體(Hatta et al., 2000; Sehgal et al., 1999)，使用的抗原是不活化的鉤端螺旋體死菌。Smits 等人收集了全世界五大洲十二個國家共兩千多個檢體來評定其效用並與 IgM- ELISA 做比較，發現其敏感性及特異性可分別達 60.1%、94.1%，且與 IgM- ELISA 有很好的一致

性，因此認為此方法可適用於國際間(Smits et al., 2000a)。本實驗同樣利用浸液試片檢驗方法(dipstick test)，但採用鈎端螺旋體重組蛋白質 LipL32 為抗原，評估此法是否適用於鈎端螺旋體感染症之血清學診斷。其敏感性甚低為 14.9%，但特異性高達 81.0%，造成敏感性甚低的原因除了抗原量的多寡外，另外有可能是 LipL32 重組蛋白質抗原對 IgG 抗體的敏感性較佳，而該 Dipstick test 是以偵測 IgM 抗體為主要目的，故敏感性較差。有碩士論文提及利用 LipL32 重組蛋白質抗原以酵素結合免疫吸附法來偵測鈎端螺旋體感染症之 IgG 及 IgM 抗體 (林, 2004)。結果在 IgG-ELISA 試驗之敏感性為 97.1%，特異性為 71.9%。在 IgM-ELISA 試驗之敏感性為 80.3 %，特異性為 63.0%。其中 LipL32- ELISA 在 IgG 抗體的偵測，於多種鈎端螺旋體血清型存在的台灣地區 具有快速診斷能力，在操作過程上酵素結合免疫吸附法可同時偵測大數量的血清樣本，避免藉由人工判讀造成偏差並得到客觀的觀測值。故未來可考慮增加 LipL32 重組蛋白質抗原量及以 IgG 抗體為主要偵測目的來進行改良。

參考文獻

- 衛生署疾病管制局，2002，鈎端螺旋體病臨床症狀、診斷及治療指引，台北。
- 林卉宜，2004，利用乳膠凝集試驗快速篩檢及應用 LipL32 重組蛋白質以酵素結合免疫吸附法進行鈎端螺旋體感染症之血清學診斷，台灣大學碩士論文。
- Adler, B., Faine, S. 2002. The genus *Leptospira*. In *The prokaryotes*, 3.9, R., ed. (New York), pp. 1-28.
- Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F.P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E.D., Ferreira, A.G., Riley, L.W., Reis, M.G., Haake, D.A., Ko, A.I., 2001, Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 39, 3303-3310.
- Haake, D.A., Chao, G., Zuerner, R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P.N., Bolin, C.A., 2000, The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 68, 2276-2285.
- Hatta, M., Smits, H.L., Gussenhoven, G.C., Gooskens, J., 2000, Introduction of a rapid dipstick assay for the detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin m antibodies in the laboratory diagnosis of leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31, 515-520.
- Levett, P.N., 2001, Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14, 296-326.
- Sehgal, S.C., Vijayachari, P., Sharma, S., Sugunan, A.P., 1999, LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93, 161-164.
- Sehgal, S.C., Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Umapathi, T., 2003, Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 52, 897-901.
- Smits, H.L., Hartskeerl, R.A., Terpstra, W.J., 2000a, International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. *Trop Med Int Health* 5, 124-128.
- Smits, H.L., Eapen, C.K., Sugathan, S., Kuriakose, M., Gasem, M.H., Yersin, C., Sasaki, D., Pujianto, B., Vestering, M., Abdoel, T.H., Gussenhoven, G.C., 2001b, Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 166-169.
- Yang, C.W., Wu, M.S., Pan, M.J., Hsieh, W.J., Vandewalle, A., Huang, C.C., 2002, The

Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. J Am Soc Nephrol 13, 2037-2045.



圖 1. 浸液試片檢測結果